# Etablierung von Interspezieshybridomen (Maus x Ratte) und Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Rattengliome

Ellen Dürr

Diss.
München
1984

Aus dem Institut für Tierpathologie der
Universität München
Vorstand Prof. Dr. E. Dahme
Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. D. Stavrou

# Etablierung von Interspezieshybridomen (Maus x Ratte) und Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Rattengliome

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ellen Dürr
aus Creglingen

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. D. Stavrou

Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT


Seite

EINLEITUNG 1

LITERATURÜBERSICHT 3

1. Antigenität von Hirntumoren 3
2. Herstellung, Gewinnung und Nachweis monoklonaler Antikörper 5

EIGENE UNTERSUCHUNGEN 12

A. MATERIAL UND METHODEN 12

1. Versuchstiere 12
2. Zellmaterial 12
   2.1. Zellkulturen 12
      2.1.1. Mäuse-Myelomzellinie (X63-Ag8.653) 12
      2.1.2. Zur Immunisierung verwendete Gliomzellinie 13
      2.1.3. "Target"-Zellinien 13
      2.1.4. Für Absorptionen verwendete Zellinien 15
      2.1.5. Mäuseperitonealzellen ("feeder-layer") 16
3. Konservierung von Zellen und Hybridomprodukten 17
4. Immunisierungen 18
5. Zellfusion 19
6. Chromosomendarstellung 23
7. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Hybridomen 23
8. Nachweisverfahren gliombindender Antikörper 24
   8.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF) 24
   8.2. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (micro-ELISA) 25
   8.3. Indirekte Immunofluoreszenz (IF) 27

Seite

9. Klonierung von Hybridomen 27
10. Gewinnung serumfreier Hybridomüberstände 28
11. Anreicherung von Immunglobulinen durch die Ammoniumsulfatpräzipitation 28
12. Agargel-Immunodiffusionstest 29
13. Quantitative Absorptionsversuche 30
14. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen 30

B. ERGEBNISSE 31

1. Fusionsprotokolle 31
2. Chromosomenanalyse 32
3. Ultrastrukturelle Untersuchung von Hybridzellen 35
4. "Screening"-Ergebnisse während der Klonierung 35
5. Selektion monoklonaler Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkannten 39
6. Bindungsverhalten der selektierten monoklonalen Antikörper mit Zellen anderer, chemisch induzierter Rattengliome 43
7. Kreuzreaktivität der selektierten monoklonalen Antikörper mit Zellen chemisch induzierter Kaninchengliome 43
8. Immunofluoreszenz-Test 47
9. Immunodiffusions-Test 47
10. Quantitative Absorption 47
11. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomzellen 51

DISKUSSION 52

ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 59

LITERATURVERZEICHNIS 61

## EINLEITUNG

Das Studium der Tumorzellmembran und ihrer Antigenstrukturen gehört seit einigen Jahren zu den zentralen Themen der Tumorforschung. Die in dieser Zellmembran integrierten, tumorassoziierten Antigene verursachen den Fremdcharakter der Tumorzelle und sind Grundvoraussetzung für eine humorale bzw. zelluläre Abwehrreaktion des Tumorträgers.
Auch die Tumoren des Nervensystems besitzen antigene Eigenschaften, die eine Antwort des Immunsystems hervorrufen können. Tumorassoziierte Antigene, die sowohl bei einigen Gliomtypen des Menschen (Lit. bei Neuwelt und Clark, 1978) als auch bei experimentellen, nitrosamidinduzierten Hirntumoren (Lit. bei Stavrou et al., 1980a) beschrieben wurden, induzieren im Gliomträger eine polyklonale Immunantwort. Von Gliompatienten gewonnenes Serum ist allerdings nicht standardisierbar und steht in einer gleichen Zusammensetzung nicht unbegrenzt zur Verfügung. Für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen ist es jedoch wünschenswert, monospezifische, definierbare Antikörper zu erhalten, die nur mit einem Antigen bzw. mit einer bestimmten Antigenkomponente reagieren können. Köhler und Milstein (1975) gelang es schließlich, die ersten standardisierbaren, monoklonalen Antikörper, die in fast unbegrenzter Menge reproduziert werden können, herzustellen. Sie fusionierten Milzzellen, die die Information zur Antikörperproduktion tragen, mit Myelomzellen. Die entstehenden Hybridzellen lassen sich als Zellkultur züchten und geben Antikörper einer prädefinierten Spezifität in ihr Kulturmedium ab. Da eine Plasmazelle nur Antikörper gegen eine bestimmte Determinante produziert (Burnet, 1959), können klonierte Hybridzellen ausschließlich identische Antikörper sezernieren. Im Hinblick auf die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen

spontane Tumoren des Menschen bekamen neben Intraspeziesfusionen v.a. Interspeziesfusionen Bedeutung. Bei ihnen kann man, im Gegensatz zu Intraspeziesfusionen, bei denen erst eine Maus gegen entsprechende Tumorzellen sensibilisiert wird, bevor ihre Milzzellen mit Mäusemyelomzellen fusioniert werden, direkt die Lymphozyten eines Tumorpatienten zur Fusion mit Myelomzellen verwenden. Derartige in vitro gewonnene Antikörper könnten in reiner Form bzw. enzym- oder radionuklidgekoppelt, die diagnostische Erfassung solider Tumoren oder metastasierter Tumorzellen erleichtern. Ihre Applikation, auch nach Koppelung an zytotoxische Substanzen, könnte ein gezieltes Zerstören von Tumorzellen ermöglichen, ohne normales Gewebe zu beeinträchtigen.

# LITERATURÜBERSICHT

## 1. Antigenität von Hirntumoren

Voraussetzung für die immunologische Überwachung ("surveillance") des Tumorwachstums ist das Vorhandensein von assoziierten Antigenen auf der Tumorzellmembran (Warnatz, 1975). Die Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß sowohl spontane (Lit. bei de Tribolet et al., 1980) als auch chemisch induzierte Hirntumoren (Lit. bei Stavrou et al., 1980a) eine humorale bzw. zellvermittelte Immunantwort im autologen und im syngenen System hervorrufen können. Mit Hilfe des "colony inhibition"-Tests und des Mikrozytotoxizitätstests wiesen zahlreiche Autoren (Kumar et al., 1973; Wahlström et al., 1973; Stavrou et al., 1977; Woosley et al., 1977; Morantz et al., 1979; Bilzer et al., 1982) auf die Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort im Gliomgeschehen hin. Darüber hinaus wurde die humorale Immunantwort gegen einige spontane und experimentelle Gliome bzw. deren assoziierte Antigene von weiteren Autoren (Kornblith et al., 1974; Stavrou et al., 1978; Coakham et al., 1980; Pfreundschuh et al., 1981) demonstriert.
Mit Hilfe aufwendiger Absorptionstechniken versuchten Coakham (1974), Fields et al. (1975), Wikstrand et al. (1979) und Schnegg et al. (1981a) nachzuweisen, daß spontane und experimentelle Tumoren neuroektodermalen Ursprungs tumorassoziierte Antigene exprimieren. Schnegg et al. (1981a) immunisierten Kaninchen mit Gliomzellen des Menschen und absorbierten das gewonnene Serum mit drei verschiedenen Geweben. Sie charakterisierten die Antigenstrukturen dieser malignen Gliomlinie und unterschieden hierbei folgende drei Antigentypen:1) Antigene, die alle vom Neuroektoderm abstammenden Tumoren besitzen, 2) Antigene, die sowohl maligne Gliome als auch adultes Hirn aufweisen und 3) Antigene, die nur auf einigen Gliomen vor-

handen sind. Die später von Schnegg et al. (1981b) hergestellten monoklonalen Antikörper unterstrichen diese Beobachtungen. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper konnte somit die Existenz tumorassoziierter Antigene bestätigt werden. Des weiteren wiesen Minna et al. (1981) mit Hilfe monoklonaler Antikörper tumorassoziierte Antigene bei Lungenkarzinomen nach, während Herlyn et al. (1979) und Koprowski et al. (1979) diese beim Kolonkarzinom aufzeigten. Eine Reihe anderer Autoren (Mitchell et al., 1980; de Tribolet et al., 1980; Seeger et al., 1981; Yeh et al., 1981; Carrel et al., 1982; Dippold et al., 1982; Hellström et al., 1982; Lennox et al., 1982; Reisfeld et al., 1982; Sikora et al., 1982a; Wikstrand et al., 1982; de Muralt et al., 1983) demonstrierten, daß auch von Gliomen, Melanomen und Neuroblastomen tumorassoziierte Antigene exprimiert werden.

Kreuzreagierende Antigene hingegen, die bei Hirntumoren des Menschen (Coakham, 1974; Kornblith et al., 1974; Wahlström et al., 1974; Sheikh et al., 1977; Wikstrand et al., 1977; Pfreundschuh et al.,1978;Coakham et al.,1980) beschrieben worden sind, sollen nach Herbermann (1977) an chemisch induzierten Tumoren selten vorkommen. Steele et al. (1974) und Hellström et al. (1978) konnten jedoch auch hier kreuzreagierende Antigene aufzeigen.

Da es sich bei gliomassoziierten Antigenen im allgemeinen um schwache Antigene handelt (Cornain et al., 1975; Stavrou et al., 1978; Spence et al., 1979), wurde mittels verschiedener Reagentien, die definierte chemische Reaktionen mit Proteinen der Zelloberfläche eingehen, versucht, ihre Antigenität zu steigern (Lit. bei Prager und Baechtel, 1973). Stavrou et al. (1980b) immunisierten mit Trinitrophenylsulfonsäure-(TNBS)-konjugierten Rattengliomzellen Fischerratten und konnten somit, im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit nativen Gliomzellen immunisiert worden waren, einen deutlich höheren Zytotoxizitäts-Index erzielen.

## 2. Herstellung, Gewinnung und Nachweis monoklonaler Antikörper

Ende der sechziger Jahre erkannte man, daß einige Myelomformen Antikörper produzieren (Secher, 1980). Diese Myelomproteine konnten teilweise als monoklonale Antikörper identifiziert werden und dienten als Grundlage für das Studium der Immunglobulinsynthese und -struktur. Allerdings fand man weder Antigene, mit denen diese Myelomantikörper spezifische Bindungen eingingen (Secher, 1980), noch konnte man Myelomzellen veranlassen, auf einen antigenen Reiz zu reagieren. Myelomzellen lassen sich jedoch problemlos als permanente Zellkultur züchten. Bisher konnten Myelomzellen der Maus (Horibata et al., 1970; Potter, 1972), der Ratte (Galfrè et al., 1979; Bazin, 1982) und des Menschen (Nilsson et al., 1970; Olsson et al., 1980; Croce et al., 1980; Edwards et al., 1982; Karpas et al., 1982) etabliert werden.
Im Gegensatz zu Myelomzellen kann man Milzzellen in vitro, durch Stimulation mit einem bestimmten Antigen, veranlassen, Antikörper zu produzieren (Lefkovits, 1972). Klinman (1976) und Singh et al. (1979) zeigten, daß Milzfragmente nach ihrer Kultivierung monoklonale Antikörper in ihr Kulturmedium abgeben. Milzzellen lassen sich jedoch in vitro nur wenige Tage züchten.
Durch die Fusion sensibilisierter Splenozyten mit Myelomzellen konnten Köhler und Milstein (1975) Hybridzellen herstellen, die von einer Seite die Fähigkeit zur Antikörpersynthese und von der anderen Seite die Fähigkeit, als permanente Zellkultur zu wachsen, vererbt bekamen. Damit konnte in vitro ein Zellsystem etabliert werden, mit dessen Hilfe Antikörper gegen sogar ungereinigte Antigene in nahezu unbeschränktem Umfang gewonnen werden können. Köhler et al. (1978) zeigten, daß aktivierte B-Lymphozyten aus dem Milzgewebe hyperimmunisierter Tiere bevorzugte Fusionspartner darstellen. Mit ihnen ist eine

deutlich höhere Fusionsrate zu erzielen, als der Wahrscheinlichkeit nach zu erwarten wäre. Am häufigsten werden Mäusemyelom- mit Mäusemilzzellen fusioniert. Daneben werden aber auch Interspeziesfusionen (Maus x Ratte; Maus x Kaninchen; Maus x Hamster; Maus x Rind; Maus x Mensch) mit unterschiedlichem Erfolg ausgeführt. Erste Fusionsversuche zwischen Körperzellen verschiedener Spezies wurden von Ephrussi et al. (1965), Davidson et al. (1966), Scaletta et al. (1967) und Weiss et al. (1967) durchgeführt. Sie dienten jedoch noch nicht der Produktion monoklonaler Antikörper sondern der Chromosomenstudie. Schwaber und Cohen (1973) bzw. Schwaber (1975) fusionierten Mäusemyelomzellen mit peripheren Blutlymphozyten des Menschen. Die entstandenen Hybridome wurden nicht nur auf ihren Chromosomengehalt sondern auch auf die Zusammensetzung ihrer Immunglobuline untersucht. Sie sezernierten sowohl Immunglobuline der Maus als auch des Menschen bzw. gemischte Immunglobulinmoleküle.
Sofern "non-producer"-Myelomzellvarianten existieren, die entweder keine Ketten sezernieren (NS1-Ag4-1, Köhler et al., 1976a; IR 983 F, Bazin, 1982) oder nicht mehr synthetisieren (X63-Ag8.653, Kearney et al., 1979; Sp2/0-Ag14, Shulman, 1978) werden diese zur Fusion bevorzugt verwendet, da die resultierenden Hybridome nur Antikörper der zuvor spezifisch stimulierten Milzzellen produzieren können. "Non-producer"-Myelomzellen gibt es bisher nur bei Ratten- und Mäusemyelomzellinien.
Das Milz- : Myelomzellverhältnis sollte, um eine maximale Fusionsrate zu erzielen, zwischen 1:1 und 1:10 gewählt werden (Köhler et al., 1976b; Goding, 1980; Fazekas de St. Groth, 1980). Da jedoch ohne Fusionsvermittler aus $10^6$-$10^7$ Zellen nur eine Hybridzelle hervorgeht, versuchte man diese Fusionsrate mit Hilfe eines Fusogens zu verbessern. Zunächst fand das Sendaivirus Verwendung (Harris et al., 1965; Neff et al., 1968). Da Mäusemyelomzellen

jedoch keine Sendaivirusrezeptoren besitzen (Yelton et al., 1980), untersuchten Klebe und Mancuso (1981), auf der Suche nach weiteren Fusionsvermittlern, 118 membranaktive Reagentien. Hiervon zeigten 20 einen ähnlich günstigen Effekt, wie das bereits als Hybridogen bekannte Polyäthylenglykol (PEG). PEG steigerte die bisherige Fusionsrate der bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C durchgeführten Fusionen, auf das 10-100fache (Yelton, 1980). Diese PEG-Wirkung konnte durch den Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO), mit dessen Hilfe günstigere osmotische Verhältnisse zu erzielen waren, noch gesteigert werden (Norwood et al., 1976; Fazekas de St. Groth et al., 1980).

Der Ablauf einer Fusion wird nach Knutton et al. (1979) in folgende Schritte eingeteilt: Zunächst wird mit Hilfe des hydrophilen PEG eine Zelladjunktion und -agglutination ermöglicht. Nach dem Entfernen des PEGs findet die eigentliche Membranfusion statt. Die Zelle nimmt eine größere, ovoide Gestalt an, und die Kerne der bis dahin heterokaryonten Zelle verschmelzen unter Chromosomenverlust. Eine synkaryonte Zelle entsteht (Oi et al., 1980).

Die von Littlefield (1964) entwickelte Selektionsmethode läßt nur Milz-Myelomhybriden überleben. Unfusionierte Milz- und Myelomzellen bzw. fusionierte Milz-Milz- und Myelom-Myelomzellen sterben in diesem aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin-(HAT)-bestehenden Selektivmedium ab.

Kurz nach der Fusion weisen die mit einem fast vierfachen Chromosomensatz ausgerüsteten Hybridzellen häufig Chromosomenverluste auf. Dies gilt insbesondere für Interspezieshybridome, bei denen die beteiligten Fusionspartner phylogenetisch weit auseinander liegen können (Köhler, 1978). Das Überwuchern durch nicht produzierende Kolonien (Gerhard et al., 1978) stellt einen weiteren Unsicherheitsfaktor dar. Durch mehrfaches, wiederholtes Klonieren kann

man diesen beiden Problemen begegnen. Mit dem "Soft-Agar"-Verfahren (Coffino et al., 1972), der "limiting-dilution"-Methode (Lefkovits et al., 1979) und dem "mini-cloning" (Minna et al., 1981) bieten sich drei verschiedene Klonierungswege an. Ziel der Klonierung ist, die Hybridzellen so zu vereinzeln, daß sich spätere Kolonien nurmehr aus einer Hybridomzelle ableiten. Derartig vereinzelte Zellen können nur mit Hilfe eines sog. "feeder-layer" überleben. Dieser bildet eine einfache Schutzschicht zwischen dem oft toxischen Plastik und den empfindlichen Zellen, phagozytiert den Zelldetritus und synthetisiert proliferationsfördernde Proteine (Goding, 1980). Als "feeder-layer" eignen sich Makrophagen bzw. Peritonealzellen (Hengartner et al., 1978; Galfrê et al., 1977), Milzzellen (Galfrê et al., 1977; Levy et al., 1978a), Thymozyten (Lernhard et al., 1978; Hellström et al., 1980) und Fibroblasten (Kennett et al., 1978).
In den Überständen dichtgewachsener Hybridomzellkulturen können Antikörperkonzentrationen von 10-50 µg/ml erzielt werden (Goding, 1980; Secher, 1980). Sofern höhere Antikörperkonzentrationen erforderlich sind, kann man entweder die Immunglobuline des Kulturüberstandes mit Hilfe der Ammoniumsulfatpräzipitation anreichern (Fey et al., 1976) oder die Hybridome in vivo als Subkutan- oder Aszitestumoren anzüchten. Im Serum bzw. der Aszitesflüssigkeit können dann 100 bis 1000fach höhere Antikörpertiter, also 3-15 mg/ml, erreicht werden (Goding, 1980).
Bei der intraperitonealen Transplantation von Hybridomen sollen die Histokompatibilitätsverhältnisse von Transplantat und Empfänger übereinstimmen (Katz et al., 1976). Bei einer Transplantation von Interspezieshybridomen (Ratte x Maus) z.B. in die Maus ist dies jedoch nicht gewährleistet. McKearn (1980) wies einen Weg, bei dem nach einer frühzeitigen Gabe von Pristane$^{R}$ (2,6,10,14-Tetramethylpentadekan), der Verabreichung eines Anti-lymphozytenserums, einer Ganzkörper-Röntgenbestrahlung

(600-800 rad) und einer syngenen Knochenmarkübertragung, das intraperitoneale bzw. subkutane Anwachsen von Interspezieshybridomen gelingen soll.
Die Hybridomtechnologie erfordert verläßliche und leicht zu handhabende "screening"-Methoden, mit denen man in kürzester Zeit Hybridome selektieren kann. Verschiedene etablierte Testmethoden eignen sich auch für den Nachweis monoklonaler Antikörper. So bieten sich für die lichtmikroskopische bzw. photometrische Darstellung der Antikörperbindung an die "target"-Zelloberfläche die indirekte Immunperoxidase-Färbung (IPF; Nexø, 1977) und der "Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay" (ELISA; Douillard et al., 1980; Lansdorp et al., 1980; Suter et al., 1980; Posner et al., 1982) an. Darüber hinaus stehen mit dem Radioimmunassay (RIA; Fischer et al., 1980; Bechtol et al., 1980a; Kummer et al., 1981) und der indirekten Immunofluoreszenzmethode (IF; Goding, 1976; Parks et al., 1979; Posner et al., 1982) zwei weitere verläßliche Nachweismethoden zur Verfügung.

PROBLEMATIK

Obwohl die Mehrzahl der Autoren davon ausging, daß die meisten spontan entstandenen und chemisch induzierten Neoplasien tumorassoziierte Antigene besitzen, konnte ihre Existenz erst mit Hilfe monoklonaler Antikörper zweifelsfrei nachgewiesen werden.
Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper können die zur Fusion benötigten Lymphozyten (a) direkt aus dem Tumorgewebe (Sikora et al., 1981; 1982a), (b) aus einem Lymphknoten, der im Lymphabflußbereich des Tumors liegt (Schlom et al., 1980), (c) aus dem peripheren Blut (Schwaber et al., 1973; Schwaber, 1975; Croce et al., 1979) oder (d) aus der Milz des Tumorträgers gewonnen werden. Um eine beim Menschen erforderliche Milzpunktion zu umgehen, können die gewünschten Milzlymphozyten auch aus immunisierten Nagetieren (Ratte, Maus) gewonnen werden. Die hierfür nötige xenogene Immunisierung hat jedoch den Nachteil, daß sich die induzierten Antikörper nicht nur gegen tumorassoziierte Antigene sondern auch gegen fremde Histokompatibilitätsantigene und Blutgruppensubstanzen richten (Sikora, 1982b). Direkt von einem Tumorpatienten gewonnene Lymphozyten, oder aber Lymphozyten aus syngenen, mit Tumorzellen immunisierten Ratten, könnten hingegen nur Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene produzieren. In Interspeziesfusionen derartiger Lymphozyten mit Myelomzellen der Maus kann man spezifische monoklonale Antikörper sowohl des Menschen, bei dem noch keine fusionierbaren Myelomzellen für eine entsprechende Intraspeziesfusion zur Verfügung stehen, als auch der Ratte herstellen.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Milzzellen von Fischerratten, die gegen syngene Gliomzellen sensibilisiert worden waren, mit der "non-producer" Mäuse-Myelomzellinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) fusioniert werden. Durch den syngenen Immunisierungsmodus sollte

versucht werden, das Spektrum der Antikörperbildung einzuschränken. Dies sollte das spätere "screening" von Hybridomkolonien erleichtern, da Antikörper gegen Histokompatibilitätsantigene oder gegen Fremdproteinmoleküle nicht zu erwarten waren.
Darüber hinaus sollte aufgezeigt werden, ob und in welchem Umfang Hybridome entstehen würden, die stabil über einen längeren Zeitraum ausschließlich gliombindende Antikörper sezernieren.

# EIGENE UNTERSUCHUNGEN

## A. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Inzucht-Fischer-Ratten (F344) und Inzucht-Balb/c-Mäuse beiderlei Geschlechts. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen gehalten und erhielten als Standarddiät Altromin$^{R}$ und Wasser ad libidum.

### 2. Zellmaterial

#### 2.1. Zellkulturen

##### 2.1.1. Mäuse-Myelomzellinie (X63-Ag8.653)

In allen Fusionen fand ausschließlich die Balb/c-Mäuse-myelomzellinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) Verwendung. Sie ist ein Subklon von X63-Ag8, der im Gegensatz zur Ursprungslinie keine nachweisbaren Mengen an $\lambda$- und $\kappa$-Ketten sezerniert. X63-Ag8.653 gehört somit in die Reihe der sog. "non-producer"-Myelomzellinien. Die 53 Chromosomen aufweisenden Zellen sind azaguanin-resistent (ag) und bezüglich des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase negativ ($HGPRT^{-}$). Sie sterben deshalb unter der Einwirkung eines aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin-(HAT)-bestehenden Selektivmediums ab.
Die Myelomzellen wurden auf Nunc$^{R}$-Plastikflaschen (260 ml) kultiviert und erhielten als Wachstumslösung Earle's Minimum Essential Medium (EMEM), das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 10 ml einer 8,8%igen $NaHCO_3$-Lösung, 15 mg

Azaguanin, 100 000 IE Penicillin G und 0,1 g Neomycin pro Liter angereichert war. Zusätzlich wurde mit 10 ml Vitaminlösung IV (Seromed, München) pro Liter Medium die ursprünglich in EMEM enthaltene Vitaminkonzentration verdoppelt.
Die Zellen wurden bei 37°C und 5% $CO_2$ im offenen System bebrütet und im Verhältnis 1:2 bis 1:10 geteilt. Für die Fusion fanden nur Zellen in logarithmischer Wachstumsphase Verwendung.

### 2.1.2. Zur Immunisierung verwendete Gliomzellinie

Die unter 2.1.3. detailliert beschriebene Rattengliom-Zellinie 78FR-G-344 wurde zur Immunisierung der Fischerratten, deren Splenozyten später zur Fusion verwendet wurden, herangezogen.

### 2.1.3. "Target"-Zellinien

#### a) Ratten- und Kaninchen-Gliomzellinien

Die nachfolgend beschriebenen Ratten- (Tab. 1) bzw. Kaninchen-Gliomzellinien (Tab. 2) fanden als "target"-Zellen Verwendung. Sie wurden aus N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierten Hirntumoren von Fischerratten (Stavrou et al., 1980a) bzw. von Kaninchen (Stavrou et al., 1979) etabliert. Ihre gliale Herkunft wurde durch den Nachweis der spezifischen Proteine S-100 und GFAP bestätigt.

Tabelle 1: Aus chemisch induzierten Rattengliomen etablierte, permanente Zellinien

| Tumor | Tumortyp | Zellinie |
|---|---|---|
| 219/78 | pleomorphes Gliom | 78FR-G-219 |
| 284/78 | Mischgliom II | 78FR-G-284 |
| 299/78 | Astrozytom I-II | 78FR-G-299 |
| 344/78 | Mischgliom II | 78FR-G-344 |
| 41/79 | Astrozytom II | 79FR-G- 41 |

Tabelle 2: Aus chemisch induzierten Kaninchengliomen etablierte, permanente Zellinien

| Tumor | Tumortyp | Zellinie |
|---|---|---|
| 381/76 | Astrozytom II-III | 76RB-G-381 |
| 414/76-H | Astrozytom II | 76RB-G-414-H |
| 34/77 | pleomorphes Gliom | 77RB-G- 34 |
| 58/77 | Oligodendrogliom II-III | 77RB-G- 58 |
| 359/77 | pleomorphes Gliom | 77RB-G-359 |

Alle Gliomlinien wurden als Langzeitkulturen auf Nunc$^{R}$-Plastikflaschen (50 bzw. 260 ml) gezüchtet. Sie erhielten Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco 430-2100) als Wachstumslösung, das zusätzlich mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 10 ml einer 8,8%igen $NaHCO_3$-Lösung, 100 000 IE Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 0,1 g Neomycin pro Liter angereichert war. Die Zellen wurden bei

37°C im geschlossenen System bebrütet und entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit durch Trypsinierung im Verhältnis 1:5 bis 1:50 geteilt.

b) Hirn- und Nierenzellkulturen

Hirn- und Nierenzellen fanden ebenfalls als "target"-Zellen Verwendung.
Die neugeborenen Ratten wurden durch Dekapitation getötet. Das gesamte Hirn und beide Nieren wurden unter sterilen Kautelen entnommen. Die Hirnzellkultur wurde entsprechend der mechanischen Gewebedissoziations-Methode (Paul, 1980), die Nierenzellkultur entsprechend der Explantations-Methode (Paul, 1980) in Nunc$^{R}$-Plastikflaschen (50 ml) angelegt. Als Anzuchtmedium diente M 199, das außer dem 20%igen FKS-Anteil dieselben Zusätze wie Dulbecco's Modified Eagle Medium enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C im geschlossenen System bebrütet. Für die Testreihen wurden nach Möglichkeit Zellen aus der 2. Passage verwendet.

2.1.4. Für Absorptionen verwendete Zellinien

a) Permanente Rattengliom-Zellinien

Die unter 2.1.3. beschriebenen Rattengliom-Zellinien 78FR-G-344 und 78FR-G-299 fanden in steigenden Zellkonzentrationen bei Absorptionsversuchen Verwendung.

b) Hirnzellkulturen

Die Hirnzellen von fetalen, neugeborenen und 4 Wochen alten Fischerratten wurden ebenfalls auf eine absorptive Bindungsreaktion mit monoklonalen Antikörpern untersucht.
Aus den Hirnen der 4 Wochen alten Fischerratten wurde sofort nach der Entnahme eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in steigenden

Zellzahlen zu Absorptionsversuchen herangezogen.
Fetale und neugeborene Fischerratten-Hirnzellen hingegen wurden,wie unter 2.1.3. beschrieben, auf Plastikfläschchen angezüchtet und erst in der 2. Passage zu Absorptionsversuchen verwendet.

c) Ratten-Myelomzellinie Y3-Ag1.2.3.

Mit der Lou/Ws1-Ratten-Myelomzellinie Y3-Ag1.2.3. wurden ebenfalls Absorptionsversuche durchgeführt. Diese Zelllinie ist ein Subklon des Lou-Rattenmyeloms S210 (Bazin et al., 1972) und wurde von Burtonboy et al. (1973) etabliert. Y3-Ag1.2.3.-Zellen sezernieren noch kappa-Immunglobulinketten und sind azaguaninresistent. Die Zellen wurden auf Nunc$^{R}$-Plastikflaschen (260 ml) kultiviert und erhielten als Wachstumslösung Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco 430-2100), das zusätzlich mit 10% FKS, 10 ml einer 8,8%igen $NaHCO_3$-Lösung, 100 000 IE Penicillin G, 0,1 g Neomycin und 0,1 g Streptomycin pro Liter angereichert war. Die Zellen wurden bei 37$^{o}$C im geschlossenen System bebrütet und durch Trypsinierung im Verhältnis 1:10 geteilt.

2.1.5. Mäuseperitonealzellen ("feeder-layer"-Zellen)

Zwei bis zehn Tage vor der Makrophagengewinnung wurden adulte Mäuse beiderlei Geschlechts mit 0,5 bis 1,0 ml eines 10%igen Thioglycollate-Mediums (Difco Labs. Detroit, Mich., U.S.A.) intraperitoneal vorbehandelt (Schimmelpfennig et al., 1980). Das Thioglycollate-Medium sollte, um eine größtmögliche Zellausbeute zu erhalten, 2 bis 4 Monate vor seiner Anwendung, bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden (Mishell, 1980).

Die Tiere wurden in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet und in 70%igen Äthylalkohol getaucht. Nach einem kleinen Hautschnitt in die Kniefalte wurde die Bauchhaut nach kranial abgezogen. Nun wurde mit einer weitlumigen Kanüle (0,9 mm x 3,8 mm) 5 ml eines Standardmediums aus einer Einweg-Plastikspritze mehrmals vorsichtig, um Blutbeimengungen zu vermeiden, in die Bauchhöhle gespritzt und wieder aufgesaugt. Die aus der Bauchhöhle gewonnene Spülflüssigkeit wurde in eisgekühlte ($0^{o}C$) konisierte Glasröhrchen transferiert und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge Standardmedium aufgelöst, so daß mindestens $1 \times 10^{6}$ Peritonealzellen/ml enthalten waren.
Pro Vertiefung einer Mikroplatte wurden 10 µl, pro Vertiefung einer (24)-Linbroplatte wurden 100 µl verteilt. Auf Nunc$^{R}$-Plastikflaschen wurde 1,0 ml dieser Zellsuspension gegeben.

## 3. Konservierung von Zellen und Hybridomprodukten

Es wurden nur optimal wachsende Zellen eingefroren. Dem jeweiligen Grundmedium wurden 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) zugesetzt.
Die Zellmenge einer Linbrovertiefung (ca. $10^{5}$-$10^{7}$ Zellen) wurde in 1,0 ml des Einfriermediums aufgenommen und 4 Stunden bei $4^{o}C$ vorgekühlt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei $-90^{o}C$ tiefgefroren (Ashwood-Smith, 1961). Die Zellen wurden bei Bedarf schockartig aufgetaut und stets auf (24)-Linbroplatten unter Zuhilfenahme eines "feeder-layers" neu angezüchtet. Nach ein bis zwei Stunden, sobald sich die Zellen auf dem Boden ihrer Linbrovertiefung abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

Kulturüberstände wurden mit 0,2% Natriumazid ($NaN_3$) versetzt und bei Kühlschranktemperatur ($4^oC$) aufbewahrt (Fey et al., 1976; Goding, 1980).

## 4. Immunisierungen

Fischerratten beiderlei Geschlechts wurden mit der Gliomlinie 78FR-G-344 immunisiert. Die Tiere erhielten als Grundimmunisierung 1 x $10^6$ mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS, Sigma, München; Lemmonier et al., 1977; Stavrou et al., 1981) modifizierte Zellen subkutan bzw. intraperitoneal transplantiert. Für die Herstellung einer 10 mM TNBS-Lösung wurden 0,2932 g TNBS in 100 ml eines 0,05 M Natriumphosphat-Puffers (pH 7,4) gelöst. Die mechanisch geernteten Gliomzellen wurden 3 x in PBS-A gewaschen, auf eine Konzentration von 5 x $10^7$/ml PBS-A eingestellt und mit 1,0 ml vorgewärmter TNBS-Lösung/5 x $10^7$ Zellen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei $37^oC$ wurden die Zellen solange mit PBS-A gewaschen, bis der Überstand klar war.
Die Boosterung erfolgte nach einer Ruhezeit von mindestens 3 Monaten, wobei die Tiere 5-8,5 x $10^6$ native Zellen intraperitoneal injiziert bekamen.
Die Fusionen 23 und 24 erfolgten direkt nach der Erstimmunisierung ohne vorherige Boosterung.

## 5. Zellfusion

Für den Fusionsablauf dienten insbesondere die Arbeiten von Davidson et al. (1976), Galfrē et al. (1977) und Fazekas de St. Groth et al. (1980) als Vorlage (Abb. 1).

Unter der Einwirkung einer 50%igen (v/v) PEG 4000-Lösung mit 5%igem (v/v) DMSO-Zusatz wurden Mäusemyelomzellen (X63-Ag8.653) mit Rattenmilzzellen, die gegen 78FR-G-344 sensibilisiert worden waren, fusioniert.

### Vorbereitung der Myelomzellen

Am Vortag der Fusion wurden die Kulturen 1:2 geteilt und mit EMEM/20% FKS gefüttert. Für die Fusion fanden nur Zellen, die sich in logarithmischer Wachstumsphase befanden, Verwendung.
Etwa eine halbe Stunde vor der eigentlichen Zellfusion wurden die Myelomzellen mechanisch vom Boden der Plastikflasche abgelöst und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurden ca. $10^7$ Myelomzellen in 10 ml serumfreiem RPMI/Na-EDTA gesammelt und gezählt. Der Zellsuspension wurden 0,5 ml für die HAT-Testreihe entnommen. Das RPMI 1640 Medium (Flow-Labs., Bonn) enthielt einen Zusatz von 3,5 ml einer 1%igen Na-EDTA-Lösung pro Liter Medium.

### Vorbereitung der Milzzellen

Die immunisierte Fischerratte wurde in Äthernarkose durch Genickdislokation getötet. Nach der sterilen Milzentnahme wurde diese in kleine Stückchen geschnitten und unter beständigem Zutropfen von 8,0 ml EMEM/10% FKS durch ein Sieb (Porenweite 60 µ) gedrückt. Während der nun folgenden 3-5 min konnten sich in dem konisierten Zentrifugenröhrchen die größeren Milzpartikel absetzen. Die überstehende Suspension wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen

übergeführt und 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml serumfreiem RPMI/Na-EDTA resuspendiert und gezählt.

Fusion

In den Fusionsversuchen wurden 1-2 x $10^7$ Myelomzellen in 10 ml serumfreiem RPMI/Na-EDTA suspendiert, auf das Milzzellpellet von 1-2 x $10^8$ Zellen gegeben, vorsichtig suspendiert und gemeinsam zentrifugiert (10 min bei 200 x g). Dabei wurde möglichst ein Milz- : Myelomzellverhältnis von 10:1 eingehalten.
Das aus Milz- und Myelomzellen bestehende Pellet wurde sorgfältig trocken gesaugt. Daraufhin wurde äußerst schonend, langsam und unter beständigem Schütteln eine 50%ige Polyäthylenglykollösung aufgeträufelt. Die PEG-Lösung bestand aus einem Volumenanteil geschmolzenem, sterilem PEG (MG 4000, Merck, Darmstadt), einem Volumenanteil sterilem Aqua bidest. und 5% DMSO (Fazekas de St. Groth et al., 1980). Die Fusionslösung hatte einen pH von 8,4. Während der bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C durchgeführten Fusion wurde folgender Zeitplan eingehalten:

| | Einwirkzeit der PEG-Lsg. (min) | Temperatur |
|---|---|---|
| 1. Pellet + 1 ml PEG/Aqua bidest./DMSO-Lösung | 1 | RT* |
| 2. Inkubationsphase im Wasserbad | 1,5 | 37°C |
| 3. + 1 ml serumfreies RPMI/Na-EDTA tropfenweise hinzufügen | 0,5 | RT* |
| 4. + 3 ml serumfreies RPMI/Na-EDTA tropfenweise hinzufügen | 0,5 | RT* |
| 5. + 6 ml serumfreies RPMI/Na-EDTA langsam hinzufügen | 1 | RT* |
| 6. + ca. 40 ml RPMI/Na-EDTA/10%FKS (Ruhephase) | 5-10 | RT* |
| 7. Zentrifugation 10 min/200 x g | | |

* RT = Raumtemperatur

Im Anschluß daran wurde das Zellpellet vorsichtig suspendiert und schließlich in 200 ml HAT-Medium aufgenommen. Diese Menge wurde auf vier (24)-Linbroplatten verteilt. Als "feeder-layer" fungierten Mäuseperitonealzellen ($1 \times 10^6$/ml). Sie waren schon am Vortag auf die entsprechenden Linbroplatten ausgesät worden.
Das HAT-Selektionsmedium bestand aus Earle's Minimum Essential Medium, dem pro Liter 10 ml einer 10 mM Hypoxanthin-1/6 mM Thymidinvorratslösung (Sigma, München), 10 ml einer 0,04 mM Aminopterinvorratslösung (Sigma, München), 100 000 IE Penicillin G, 0,1 g Streptomycin, 10 ml Vitaminlösung IV (Seromed, München) und 20% FKS zugesetzt wurden.
In 6 Linbrovertiefungen wurden unfusionierte Myelomzellen dem HAT-Medium als Kontrolle ausgesetzt. Die Zellen wurden bei $37^{\circ}C$ und 5% $CO_2$ in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Atmosphäre bebrütet. Schon ein bis zwei Tage nach der Einwirkung des HAT-Mediums zeigten die X63-Ag8.653-Myelomzellen der Kontrollreihe deutliche Zytoplasma-Degenerationserscheinungen; nach vier bis fünf Tagen waren sie abgestorben.
Drei Tage nach der Fusion, danach zweimal pro Woche, wurde das Medium durch frisches HAT-Medium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt konnte man kleine, etwa 2-5 Zellen zählende Hybridomhäufchen erkennen. Nach knapp einer Woche zeigten die Kolonien deutliches Wachstum. Zwei Wochen nach der Fusion konnten die ersten Kulturüberstände getestet und Kolonien isoliert werden.
Nach zwei bis drei Wochen, als absehbar war, daß die Kolonien stabil wuchsen, wurde das HAT-Medium durch aminopterinfreies Medium ersetzt. Parallel dazu wurde der Mediumanteil von 20% FKS schrittweise auf 10% FKS reduziert. Der HT-Zusatz zum Medium wurde bis zum Ende der Versuchsreihe beibehalten, da die Zellen hierbei ein optimales Wachstum zeigten.

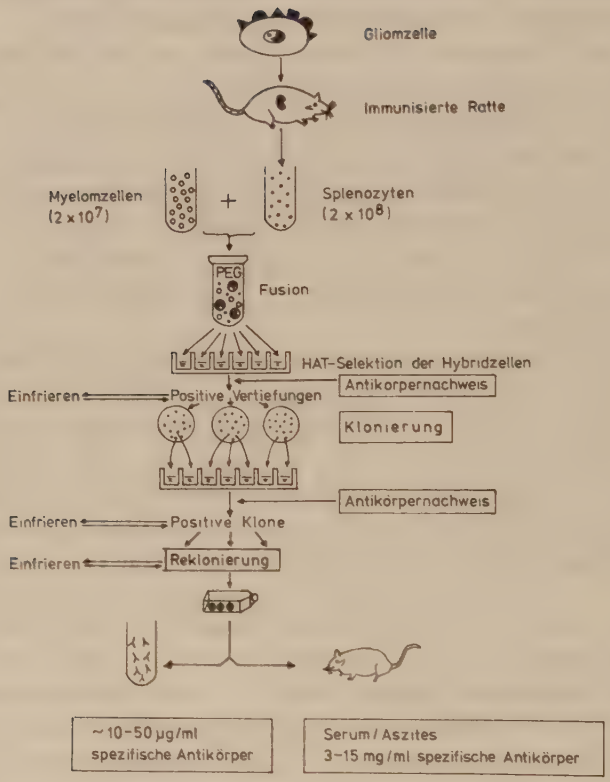


Abb. 1: Produktion monoklonaler Antikörper mit Hilfe der Zellhybridisierungstechnik

## 6. Chromosomendarstellung*

Mäusemyelom- und Hybridomzellen wurden eine Stunde bei 37°C mit Colcemid (0,6 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sieben Minuten lang einer 0,08 M KCl-Lösung ausgesetzt, gewaschen und in Methanol/Eisessig (3:1) bei 4°C fixiert (Rothfels et al., 1958; Schwaber, 1975). Diese Probe wurde auf einen Objektträger aufgetropft, getrocknet, gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

## 7. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Hybridomen**

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurden die auf 50 ml Fläschchen wachsenden Hybridomzellen mit PBS-A gewaschen, in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Nun wurden die Zellen 20 min in 1,25%igem Glutaraldehyd fixiert, erneut mit PBS-A gewaschen, abzentrifugiert und in 1%igem Osmiumtetroxid für 20 min nachfixiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden sie dehydriert und in Epon eingebettet.
Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt und Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

* Die zytogenetische Auswertung der Chromosomenpräparation wurde freundlicherweise von Herrn Dr. J. Delinassios (Dept. of Cell Biology, Hellenic Anticancer Institute, Athens) durchgeführt.

** Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. T. Bilzer (Lehrstuhl für Allg. Pathologie und Neuropathologie (Prof. Dr. E. Dahme) am Institut für Tierpathologie der Universität München) durchgeführt.

## 8. Nachweisverfahren gliombindender Antikörper

### 8.1. Indirekte Immunperoxidasefärbung (IPF)

Die indirekte Immunperoxidasefärbung wurde als erstes "screening"-Verfahren nach der Fusion angewandt, um die antikörperproduzierenden Hybridome zu ermitteln. Ein bzw. zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden "monolayer"-Zellkulturen (500-1000 der zu untersuchenden Zellen pro Vertiefung) auf Terasakiplatten angelegt (Pateraki, 1981). Die Zellen sollten am Tag des Tests semikonfluent sein und möglichst als Einzelzellen erkennbar sein. Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen einmal mit temperiertem PBS-A gewaschen und 5 min mit Methanol : Aceton (1:1) bei $4^{o}C$ fixiert. Nach 10-20 min Lufttrocknung wurden 20 µl des ersten Antikörpers in Form von Hybridomkulturüberstand in jede Vertiefung gegeben und in zugedecktem Zustand bei $37^{o}C$ eine Stunde inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde, bei zwischenzeitlicher 20 minütiger Inkubation mit PBS-A, der zweite Antikörper (20 µl) aufgetragen. Das Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen) war zuvor in PBS-A/5% FKS 1:100 verdünnt worden. Die anschließende Inkubationsdauer und der Waschvorgang entsprechen dem ersten Teil der Färbung.
Mit Hilfe des folgenden Substrates wurde der Antigen-Antikörperkomplex sichtbar: 20 mg 3-amino-9-äthyl-Carbazoi (Sigma, München) wurden in 5 ml Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) gelöst, in 95 ml 50 mM Acetatpuffer (pH 5) aufgenommen, filtriert und kurz vor Gebrauch mit 50 µl $H_2O_2$ (30%ig) versetzt (Nexø, 1977).
Nach einer 10 minütigen Einwirkdauer dieses Substrates war ein deutlicher Kontrast zwischen positiven (rot angefärbten) und negativen (nicht angefärbten) Zellen zu erkennen.

Bei längerer Einwirkzeit erschwerte das Mitanfärben des Plattenhintergrundes das Auswerten. Die Platten wurden unter fließendem deionisiertem Wasser gewaschen und zur Dokumentation mit Kaiser's Glyceringelatine eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Mittels vier Färbeintensitätsgraden (stark positiv, positiv, schwach positiv und negativ) wurde hierbei der Antikörpergehalt des getesteten Hybridomüberstandes geschätzt. Als negative Kontrolle wurde Kulturüberstand von X63-Ag8.653-Myelomzellen herangezogen; als positive Kontrolle diente das, aus den jeweiligen Fusionstieren entnommene Serum, 1:20 verdünnt.
Um eventuelle falsch positive Ergebnisse auszuschließen, z.B. infolge einer unspezifischen Reaktion von Zelldeterminanten mit dem zweiten Antikörper, wurde der erste Antikörper weggelassen und durch PBS-A/5% FKS ersetzt. Darüber hinaus wurden Zellen, deren eventuell vorhandene endogene Peroxidase zuvor durch eine 30 minütige Inkubation mit Methanol und 0,5%igem $H_2O_2$ (Lansdorp, 1980) blockiert worden war, als Kontrolle mitgetestet.

## 8.2. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (micro-ELISA)

Die zu untersuchenden Zellen wurden ein bis zwei Tage vor Versuchsbeginn als "monolayer"-Kulturen auf flexiblen (96)-Mikrotestplatten (Flow Labs., Bonn, Nr. 76-381-04) angezüchtet. Es wurden 10 000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Sie wurden vor Versuchsbeginn einmal mit temperiertem PBS-A/5% FKS gewaschen und 5 min mit Methanol : Aceton (1:1) bei $4^{o}C$ fixiert (Suter et al., 1980). Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Angaben von Posner et al. (1982). Nach 10 bis 20 minütiger Lufttrocknung wurden 20 µl des ersten Antikörpers (Hybridomkulturüberstand) in jede Vertiefung

gegeben und in zugedecktem Zustand bei $4^{o}C$ eine halbe Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde, bei zwischenzeitlicher 20 minütiger Inkubation mit PBS-A/ 5% FKS, der zweite Antikörper (50 µl) aufgetragen. Das Meerrettichperoxidase-konjugierte Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen) war zuvor in PBS-A/ 5% FKS 1:100 verdünnt worden. Nach sechs abschließenden Waschschritten (inklusive der 20 minütigen Inkubation) mit PBS-A wurden 100 µl des folgenden Substrates pro Vertiefung aufgetragen: 1 mg/ml ortho-Phenylendiamin (Sigma, München) wurde in 0,1 M Citratpuffer (pH 4,5) gelöst und direkt vor der Verwendung mit 4 µl/ml einer 3%igen $H_2O_2$-Lösung versetzt. Mit Hilfe des Titertek Multiskan Photometers (Flow Labs., Bonn) wurden die Testplatten nach 30 min bei einer Wellenlänge von 492 nm ausgewertet (Douillard et al., 1980). Als Geräte-Eichwert diente eine Reihe zellhaltiger Mikroplattenvertiefungen, bei denen der zweite Antikörper weggelassen und durch PBS-A ersetzt worden war, so daß auf keinen Fall eine Reaktion mit dem Substrat stattfinden konnte.
Der negative Kontrollwert ($K^-$) entsprach der Extinktion, die mit der Inkubation von X63-Ag8.653-Überstand als erstem Antikörper erzielt wurde. Den positiven Kontrollwert ($K^+$) erhielt man nach der entsprechenden Inkubation von 1:20 verdünntem Fischerrattenserum auf den jeweils zu testenden Zellen. Dieses Serum war den, gegen die Gliomzellinie 78FR-G-344 immunisierten Tieren vor der Milzentnahme entnommen worden. Die Testergebnisse wurden dahingehend interpretiert, daß alle Extinktionswerte, die über dem zweifachen negativen Kontrollwert ($2 \times K^-$) lagen, als positiv angesehen wurden.

### 8.3. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)

Zwei bis drei Tage vor Versuchsbeginn wurden die zu untersuchenden Zellen als "monolayer"-Kulturen auf Lamellen ("cover-slips") in sog. "Leighton-tubes" angelegt. Der jeweilige Hybridomüberstand (erster Antikörper) wurde auf die einmal mit PBS-A gewaschenen, unfixierten Zellen aufgetragen und 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde, bei zwischenzeitlicher 5-minütiger Inkubation in PBS-A, der zweite Antikörper aufgetragen. Das Fluoreszinisothiocyanat-konjugierte Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobulin (Dako, Kopenhagen; Sandwich-Technik nach Coons et al., 1957) war zuvor in PBS-A 1:10 verdünnt worden. Die Zellen wurden wie oben inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Einschluß in gepuffertem Glycerol. Zum Vergleich wurden Präparate herangezogen, die mit X63-Ag8.653-Überstand ($K^-$) bzw. 1:20 verdünntem Rattenserum ($K^+$) inkubiert worden waren.

## 9. Klonierung von Hybridomen

Die in der IPF als antikörperpositiv selektierten Hybridome wurden nach der Endpunktverdünnungsmethode (Goding, 1980) kloniert. Das Überwuchern durch nicht produzierende Hybridomkolonien konnte somit weitestgehend vermieden werden. Die Zellen der positiven Hybridomkolonien wurden unter Zuhilfenahme von Mäuseperitonealzellen als "feeder-layer" (Hengartner et al., 1978) stark verdünnt in die Vertiefungen von (96)-Mikrotestplatten (Nunc, Roskilde Dänemark) ausgesät. Die Überstände von dicht gewachsenen Kulturen wurden erneut mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung untersucht. Die hieraus resultierenden positiven Kulturen

wurden noch mindestens zweimal diesem Vorgang unterworfen. Nach schließlich dreimaligem Klonieren, wobei die Klonierungsergebnisse gegen 100% tendieren sollten, wurden aus jeder Stammkolonie mindestens drei Klone etabliert. Sie wurden, um ihre Antikörperproduktion stabil zu halten, von Zeit zu Zeit erneut kloniert.

## 10. Gewinnung serumfreier Hybridomüberstände

Nachdem die jeweilige Hybridomkolonie auf 260 ml Plastikflaschen und 10% FKS-haltigem HT-Medium einen semikonfluenten Zustand erreicht hatte, wurde der gesamte Überstand dekantiert und die Zellen mit serumfreiem HT-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit serumfreiem HT-Medium beschichtet. Der Überstand wurde erst nach dem Absterben des dicht gewachsenen Hybridomzellrasens gewonnen, 10 min bei 400 x g zentrifugiert, mit 0,02%igem $NaN_3$ konserviert und bei Kühlschranktemperatur gelagert.

## 11. Anreicherung von Immunglobulinen durch die Ammoniumsulfatpräzipitation

Aus 1000 g $(NH_4)_2SO_4$ ad 1000 ml Aqua dest. wurde eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung hergestellt. Sie wurde mit 30%iger NaOH auf einen pH von 7,0 bis 7,1 eingestellt. Der serumfrei gewonnene Hybridomkulturüberstand und die Ammoniumsulfatlösung wurden 1:1 gemischt und eine Stunde ins Eisbad gestellt (Fey et al., 1976). Das Präzipitat wurde eine halbe Stunde bei 48 000 x g und $4^{o}C$ ultrazen-

trifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in einer kleinen Menge 2 M Ammoniumsulfatlösung aufgenommen und erneut ultrazentrifugiert. Dieses Sediment wurde anschließend in 1-2 ml Aqua bidest. (Jonak, 1980) gelöst, in einen Dialyseschlauch, der zuvor 10 min in 2,5 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließend dreimal in kochendem Aqua bidest. gewaschen worden war, gefüllt und gegen 0,2 M Barbitalpuffer (pH 7,2-7,4) bzw. PBS-A (pH 7,2-7,3) dialysiert. Der Dialysevorgang war beendet, als das Außendialysat frei von $SO_4^{2-}$-Ionen war ($BaCl_2$-Nachweis: 5 ml Außendialysat werden mit 2 N HCl angesäuert und anschließend mit drei Tropfen 10%iger $BaCl_2$-Lösung versetzt. Das schwerlösliche $BaSO_4$ fällt als weißer Niederschlag aus).

## 12. Agargel-Immunodiffusionstest

Die Immunglobulinklassen der monoklonalen Antikörper wurden mit Hilfe des Immunodiffusionstests nach Ouchterlony (1962) bestimmt. Hierbei wurden 20 µl der durch die Ammoniumsulfatpräzipitation auf das zehn- bis zwanzigfache eingeengten, serumfreien Hybridomkulturüberstände alternierend in die peripheren Vertiefungen einer Immunodiffusionsplatte (Miles Labs., U.S.A.) pipettiert. Die dazwischenliegenden Vertiefungen wurden mit PBS-A, die zentrale Vertiefung mit Ziege-anti-Ratten-IgG (Cappel Labs., Cochranville, PA., U.S.A.) bzw. Kaninchen-anti-Ratten-IgM (Nordic Immunological Labs., Tilburg, Niederlande) beschichtet. Sobald die Überstände wegdiffundiert waren, wurden die Vertiefungen noch drei- bis viermal nachgefüllt. Schon nach 24 Stunden konnte man deutliche Präzipitationslinien erkennen.

## 13. Quantitative Absorptionsversuche

Für die Durchführung quantitativer Absorptionsversuche wurden 100 µl eines unverdünnten $NaN_3$-konservierten oder frischen Hybridomkulturüberstandes mit einer steigenden Anzahl ($10^4$, $10^5$, $10^6$, $10^7$) Gliomzellen bzw. frisch gewonnener oder kultivierter Fischerrattenhirnzellen eine Stunde bei Raumtemperatur und 15 Stunden bei $4^oC$ inkubiert (Bechtol, 1980b). Die Zellen wurden von Zeit zu Zeit resuspendiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sie 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe der IPF- und der ELISA-Technik auf verbleibende Antikörper getestet.

## 14. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomen

Etablierte Hybridomklone, die inzwischen stabil und makrophagenfrei auf 50 bzw. 260 ml Fläschchen wuchsen, wurden in einer Konzentration von 5 x $10^6$ bis 15 x $10^6$ Zellen in die Bauchhöhle von Balb/c Mäusen transplantiert (Katz und Benaceraf, 1976; McKearn, 1980). Mindestens drei Wochen und maximal acht Wochen vor der Transplantation bekamen die Mäuse 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadekan (Pristane$^R$, Ega Chemie, Steinheim) intraperitoneal injiziert (McKearn, 1980).

## B. ERGEBNISSE

### 1. Fusionsprotokolle

In insgesamt 24 Fusionsversuchen wurden Milzzellen hyperimmunisierter Fischerratten mit Mäusemyelomzellen der Linie X63-Ag8.653 fusioniert (Tab. 3). Der Anteil an Plattenvertiefungen mit Hybridomwachstum variierte erheblich (Tab. 4).

Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere auf die Ergebnisse der Fusionen 17, 21, 22 und 24, mit denen in der Folge weitere Untersuchungen durchgeführt wurden, eingegangen. Die übrigen Fusionen finden nur kurze, tabellarische Erwähnung.

Bei einem Zelleinsatz von $2 \times 10^7$ Myelomzellen und $2 \times 10^8$ Milzzellen entstanden in den vier oben hervorgehobenen Fusionen pro Fusion zwischen 53 und 64 verschiedene Hybridome, wobei pro Linbrovertiefung maximal eine Hybridomkolonie gewertet wurde. Somit kamen auf eine Million zur Fusion verwendete Myelom- bzw. Milzzellen mindestens drei Hybridzellen.

Eine Hybridomkolonie wurde unter dem Gesichtspunkt definiert, daß eine Plattenvertiefung mit Hybridomwachstum mindestens eine X63-Ag8.653 x Splenozyt-Hybridzelle enthalten haben muß. Die Möglichkeit, daß mehrere verschiedene Hybridzellen in dieselbe Linbrovertiefung ausgesät wurden, konnte ebensowenig statistisch erfaßt werden, wie die Tatsache, daß aus einer Hybridomkolonie Zellen abgeschwemmt werden konnten, die dann innerhalb dieser Linbrovertiefung neue, eigenständige Tochterkolonien bildeten. Um nun nicht mit mehreren, ursprünglich identischen Hybridomkolonien weiterzuarbeiten, wurden für die Folgeexperimente nur eine Kolonie bzw. ein Klon pro Linbrovertiefung ausgewählt.

Etwa drei Tage nach der Fusion konnte man zwischen absterbenden, unfusionierten Zellen kleine, zunächst 2-5 Zellen

zählende Hybridomzellgruppen entdecken. Die X63-Ag8.653-Myelomzellen der HAT-Kontrollreihe waren nach 2-3 Tagen zugrunde gegangen. In etwa der Hälfte aller Plattenvertiefungen konnte man, z.T. sogar makroskopisch, Zellhäufchen erkennen (Abb. 2).
Die Ergebnisse der IP-Färbung mit der "target"-Zellinie 78FR-G-344 zeigten, daß zwischen 6,8 und 100% der Plattenvertiefungen mit Wachstum antikörperproduzierende Hybridome enthielten (Tab. 4).

2. Chromosomenanalyse

Die zytogenetische Auswertung verschiedener noch unklonierter Hybridomzellen aus den Fusionen 12 bzw. 15 zeigte, daß tetraploide Zellen entstanden waren, die Chromosomenzahlen zwischen 79 und 92 aufwiesen. Der Chromosomensatz der Mäusemyelomlinie X63-Ag8.653 hingegen beträgt 53.
Der tetraploide Chromosomensatz der Hybridzellen weist darauf hin, daß Zellfusionen zwischen Myelom- und Milzzellen (es kann nur diese Fusionskombination im HAT-Medium überleben) stattgefunden hatten.

Tabelle 3: Protokoll der Zellfusionen 1-24

| | | verwendete Zellzahlen | Milzzellen/Myelomzellen |
|---|---|---|---|
| Myelomzellinie: | X63-Ag8.653 | $1\text{-}2 \times 10^7$ | 10 : 1 |
| Fischerratten (♀ + ♂): | Milzzellen | $1\text{-}2 \times 10^8$ | |
| Antigen: | Gliomzellinie 78FR-G-344 | | |
| Immunisierung: | Grundimmunisierung: | $1 \times 10^6$ TNBS-modifizierte Gliomzellen s.c./i.p. | |
| | Boosterung: | $5\text{-}8{,}5 \times 10^6$ native Gliomzellen i.p. nach 3 Monaten | |
| Fusogen: | PEG, MG 4000, 50% (v/v) + 5% DMSO (v/v) | | |
| Arbeitstemperatur: | Raumtemperatur ($21^{\circ}C$) | | |
| Stabilisierung: | 10 min bei $37^{\circ}C$ im Wasserbad | | |
| "feeder-layer": | Mäuseperitonealzellen | | |

Tabelle 4: Anzahl der entstandenen und antikörperproduzierenden bzw. klonierten Hybridomkolonien aus den Fusionen 1-24

| Nr. der Fusion | Plattenvertiefungen mit Hybridomwachstum | antikörperpositive Plattenvertiefungen | Anzahl der klonierten Kolonien |
|---|---|---|---|
| 1-10 | 0 | ----- | ----- |
| 11 | 74/90 (82,2%) | 5/74 ( 6,8%) | 5 |
| 12 | 75/90 (83,3%) | 10/75 (13,3%) | 8 |
| 13-14 | 0 | ----- | ----- |
| 15 | 12/90 (13,3%) | 7/12 (58,3%) | 7 |
| 16 | 0 | ----- | ----- |
| 17 | 58/90 (64,6%) | 9/58 (15,5%) | 4 |
| 18 | 3/90 ( 3,3%) | 3/ 3 (100 %) | 0 |
| 19 | 14/90 (15,6%) | 3/14 (21,4%) | 3 |
| 20 | 8/93 ( 8,6%) | 4/ 8 (50,0%) | 4 |
| 21 | 64/93 (68,8%) | 22/64 (34,4%) | 17 |
| 22 | 53/93 (57 %) | 22/53 (41,5%) | 14 |
| 23 | 0 | ----- | ----- |
| 24 | 53/93 (57 %) | 15/53 (28,3%) | 12 |
| Total | 414/912 (45,4%) | 100/414 (24,2%) | 74 |

## 3. Ultrastrukturelle Untersuchung von Hybridzellen

Drei Hybridomkolonien aus der 12. Fusion wurden im Hinblick auf eine virale Kontamination ultrastrukturell untersucht. Die Mehrzahl der Hybridomzellen enthielt eine große Anzahl intrazellulärer Viruspartikel (Stavrou et al., 1983b). Darüber hinaus konnte man das "Budding"-Phänomen und extrazelluläre Typ C Partikel erkennen. Ein Teil der intrazellulären Partikel war eindeutig intrazisternal, während ein anderer Teil nur schwer einer bestimmten Zellstruktur zugeordnet werden konnte (Abb. 2).
Morphologisch gleiche Virusstrukturen konnten bei der Mäusemyelomzellinie X63-Ag8.653 nachgewiesen werden. Bei den zur Fusion verwendeten Milzzellen aus Fischerratten konnten, zumindest elektronenmikroskopisch, keine Viruspartikel dargestellt werden.

## 4. "Screening"-Ergebnisse während der Klonierung

Aus jeder antikörperpositiven Vertiefung wurden verschiedene Kolonien entnommen und nach einer weiteren IP-Färbung je eine Kolonie weitergezüchtet. 74 dieser Kolonien wurden dem Klonierungsverfahren unterworfen. Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, gab es mehr antikörperpositive Hybridomkolonien, als schließlich zur Klonierung gelangten. Dies lag daran, daß z.T. schon vor dem Klonierungsverfahren festgestellt wurde, daß einige Hybridomprodukte nicht nur mit der Gliomzellinie 78FR-G-344 sondern auch mit normalen Rattenhirn- bzw. Rattennierenzellen Reaktionen eingingen. Solche Hybridomkolonien wurden von vorneherein vom Klonierungsgeschehen ausgeklammert.

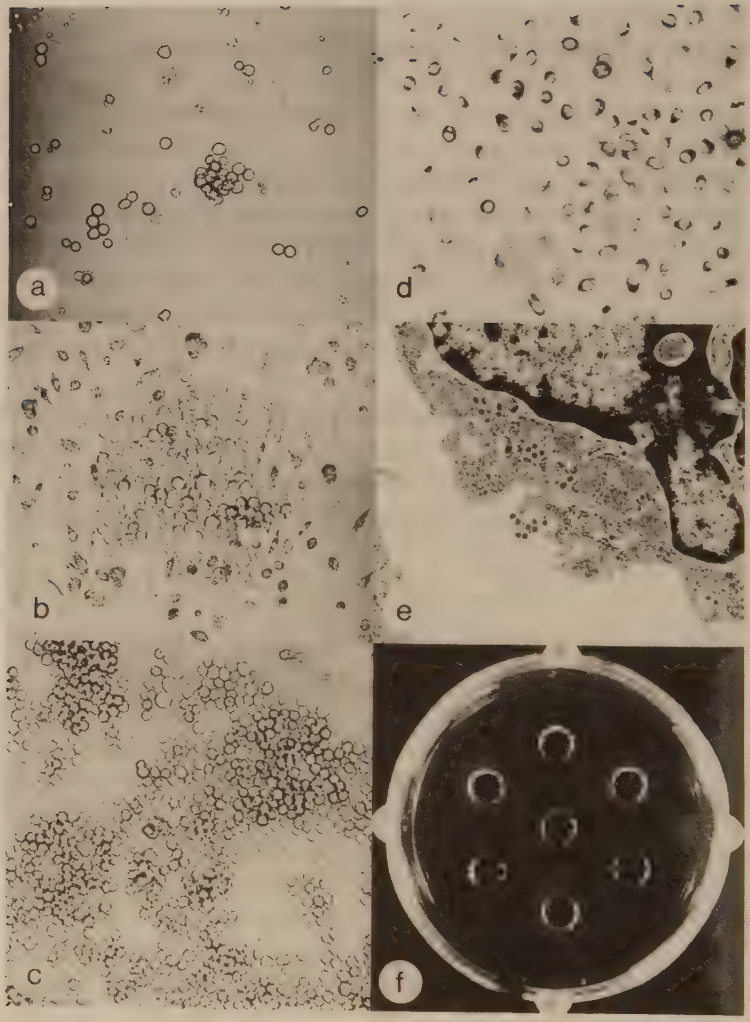


Abb. 2: Hybridzellkulturen am 1. Tag (a), 5. Tag (b) und am 7. Tag (c) nach der Fusion.

(d) Indirekte Immunperoxidasefärbung: Auf einzelne Stellen der Zelloberfläche begrenzte Reaktionen der monoklonalen Antikörper mit Gliomzellen der Linie 78FR-G-344.

(e) Elektronenmikroskopische Darstellung intra- und extrazellulärer Viruspartikel in Hybridomzellen.

(f) Immunodiffusionstest: Darstellung der Präzipitationslinien, die sich zwischen der mit Anti-Ratten-IgG beschickten zentralen Vertiefung und jeder zweiten peripheren, mit zwanzigfach konzentriertem Klonkulturüberstand gefüllten Vertiefung ausbildeten.

(a,b,c,d: x 120; e: x 16.580; f: x 1,3)

Die Hybridomkolonien wurden insgesamt mindestens dreimal kloniert. In jedem Klonierungsabschnitt wurde für jede Kolonie die Anzahl der positiven zur Anzahl der getesteten Proben festgestellt (für Fusion 21 s. Tab. 5). Diese Prozentzahlen ermöglichen Rückschlüsse auf die Stabilität der Antikörperproduktion der Hybridome.
Während des Klonierungszeitraums (2-8 Wochen nach der Fusion) gab es einige wenige Hybridomkolonien, die ihre Immunglobulinproduktion einstellten. Bei ihnen konnte man im Verlauf der Klonierung einen steil ansteigenden Prozentsatz an nicht mehr antikörperproduzierenden Kolonien beobachten. Die meisten Hybridomkolonien erreichten jedoch im Laufe ihrer Klonierung einen steigenden Anteil an antikörperproduzierenden Zellen. Dieser Anteil sollte im Hinblick auf stabile, antikörperproduzierende Hybridomkolonien gegen 100% tendieren und keinesfalls abfallen. Im Anschluß an den dritten Klonierungsabschnitt wurden von jeder Hybridomkolonie mindestens drei Klone (C1 - C3) etabliert. Eine prozentuale Darstellung der Klonierungsergebnisse aller Fusionen wird in Tabelle 6 aufgezeigt. Die Fusionen 17, 21, 22 und 24 weisen im ersten und zweiten Klonierungsabschnitt über 70% und im dritten Klonierungsabschnitt über 80% antikörperpositive Hybridomkolonien auf.

Tabelle 5: Zahlenmäßige und prozentuale Aufschlüsselung des Anteils an antikörperpositiven Hybridomen aus Fusion 21, dargestellt als Quotient

$$\frac{\text{Anzahl der positiven Hybridomüberstände}}{\text{Anzahl der getesteten Hybridomüberstände}}$$

| Kolonie | 1. Abschnitt | 2. Abschnitt | 3. Abschnitt |
|---|---|---|---|
| A | 10/24 ( 42%) | 21/21 (100%) | 41/58 ( 71%) |
| B | 15/24 ( 63%) | 17/17 (100%) | 25/32 ( 78%) |
| C | 22/24 ( 92%) | 24/24 (100%) | ------ |
| D | 12/12 (100%) | 3/12 ( 25%) | 18/18 (100%) |
| E | 24/24 (100%) | 20/24 ( 83%) | 16/21 ( 76%) |
| F | 12/12 (100%) | 6/ 6 (100%) | 24/24 (100%) |
| G | 24/24 (100%) | 11/14 ( 79%) | 26/36 ( 72%) |
| H | 6/24 ( 25%) | 2/ 4 ( 50%) | 22/22 (100%) |
| I | 39/39 (100%) | 6/ 6 (100%) | 20/20 (100%) |
| J | 22/24 ( 92%) | 18/28 ( 64%) | 68/70 ( 97%) |
| K | 12/24 ( 50%) | 20/24 ( 83%) | 16/16 (100%) |
| L | 10/24 ( 42%) | 20/20 (100%) | 25/29 ( 86%) |
| M | 22/24 ( 92%) | 24/24 (100%) | 14/14 (100%) |
| N | 24/24 (100%) | 22/36 ( 61%) | 21/24 ( 88%) |
| O | 10/24 ( 42%) | 15/24 ( 63%) | 19/22 ( 86%) |
| P | 36/36 (100%) | 9/18 ( 50%) | 27/40 ( 68%) |
| Q | 12/12 (100%) | 10/10 (100%) | 20/24 ( 83%) |
| Total | 312/399 ( 78%) | 248/312 ( 80%) | 402/470 ( 86%) |

Tabelle 6: Prozentuale Darstellung des durchschnittlichen Anteils an antikörperpositiven Hybridomkolonien im Verlauf der drei Klonierungsabschnitte

| | 1. Abschnitt | 2. Abschnitt | 3. Abschnitt |
|---|---|---|---|
| Fusion 11 | 52 % | 87 % | 79 % |
| Fusion 12 | 54 % | 67 % | 83 % |
| Fusion 15 | 66 % | 71 % | 68 % |
| Fusion 17 | 93 % | 76 % | 81 % |
| Fusion 19 | 69 % | 17 % | 65 % |
| Fusion 20 | 81 % | 74 % | 65 % |
| Fusion 21 | 78 % | 80 % | 86 % |
| Fusion 22 | 79 % | 74 % | 83 % |
| Fusion 24 | 71 % | 84 % | 81 % |

5. Selektion monoklonaler Antikörper, die normale syngene Rattenzellen nicht erkannten

Die Überstände der verschiedenen Hybridomkolonien wurden mit Hilfe der IPF und des micro-ELISA-Tests daraufhin untersucht, ob die jeweils enthaltenen monoklonalen Antikörper nur mit Gliomzellen oder auch mit normalen Rattenzellen Bindungen eingingen. In beiden Testreihen wurden 78FR-G-344 Gliomzellen und Fischerrattenhirn- bzw. Fischerrattennierenzellen als "target"-Zellen verwendet.

Der primäre Auslesevorgang monoklonaler Antikörper, die nur Gliomzellen nicht aber normale Rattenzellen erkannten, fand mit Hilfe der IPF statt. Hierbei zeigten monoklonale Antikörper verschiedener Hybridomkolonien ein unterschiedliches Bindungsverhalten mit den Gliomzellen. Ein Teil der unter dem Lichtmikroskop betrachteten Zellen zeigte eine homogene Rotfärbung, während ein anderer Teil nur in partiellen Bereichen der Zellmembran bzw. in den Zellausläufern rote Granula aufwies (Abb. 2). Darüber hinaus schienen einzelne Zellen einer Zellpopulation im Gegensatz zu umliegenden Zellen nicht angefärbt zu sein. Diese eigentümlichen Reaktionsmuster waren konstante Eigenschaften bestimmter Hybridomklone, die sich auch bei den Kreuzreaktionsversuchen zeigten.
Von insgesamt 100 verschiedenen antikörperpositiven Hybridomzellüberständen (s. auch Tab. 4) konnten 88 mit Hilfe der IPF auf eine mögliche Reaktivität mit syngenen Rattenzellen getestet werden. Die fehlenden 12 Kolonien (vorwiegend aus den Fusionen 11 und 12) sind im ersten Klonierungsabschnitt verloren gegangen. Aus den 88 getesteten antikörperpositiven Hybridomkolonien resultierten 11 Klone, deren monoklonale Antikörper weder mit Rattenhirn- noch mit Rattennierenzellen eine Bindungsreaktion eingingen (Tab. 7).

Tabelle 7: Reaktivität verschiedener monoklonaler Antikörper mit der Rattengliomzellinie 78FR-G-344 und normalen Rattenzellen (micro-ELISA)

| Klonüberstand | 78FR-G-344 | Hirnzellen | Nierenzellen |
|---|---|---|---|
| $K^+$ | >2000 | 567 | 800 |
| $K^-$ | 25 | 20 | 25 |
| 17AC2 | 319 | 34 | 34 |
| 17BC3 | 307 | 35 | 24 |
| 21AC3 | 373 | 35 | 28 |
| 21BC3 | 327 | 40 | 41 |
| 21CC1 | 344 | 31 | 25 |
| 21EC2 | 363 | 35 | 28 |
| 22AC1 | 393 | 27 | 23 |
| 22BC1 | 259 | 47 | 33 |
| 22FC3 | 322 | 30 | 20 |
| 24CC1 | 296 | 32 | 21 |
| 24IC3 | 303 | 31 | 18 |

$K^+$ = positiver Kontrollwert
$K^-$ = negativer Kontrollwert

Einige Klone stellten trotz guten Zellwachstums im Verlauf von 2-6 Monaten nach der Fusion ihre Antikörperproduktion ein (Tab. 8). Bei Folgeuntersuchungen wurde deshalb auf eingefrorene, antikörperproduzierende Zellproben zurückgegriffen.

Tabelle 8: Klone, die ihre Antikörperproduktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fusion einstellten

| | |
|---|---|
| 15BC1 | 8 Wochen nach der Fusion |
| 17AC2 | 22 Wochen nach der Fusion |
| 17BC3 | 24 Wochen nach der Fusion |
| 19AC1 | 6 Wochen nach der Fusion |
| 19BC2 | 6 Wochen nach der Fusion |
| 22BC1 | 23 Wochen nach der Fusion |
| 24AC1 | 8 Wochen nach der Fusion |
| 24DC1 | 14 Wochen nach der Fusion |

## 6. Bindungsverhalten der selektierten monoklonalen Antikörper mit Zellen anderer, chemisch induzierter Rattengliome

Mit Hilfe der IPF und des micro-ELISA-Tests wurde untersucht, ob die selektierten monoklonalen Antikörper, außer mit der zur Immunisierung verwendeten Gliomlinie 78FR-G-344, auch noch mit anderen, ebenfalls mittels Nitrosoharnstoffs induzierten Rattengliom-Zellinien eine Bindungsreaktion eingehen würden. Die Ergebnisse der vier getesteten Gliomzellinien korrespondierten in den beiden Methoden.
Zu den Gliomzellinien 78FR-G-299 und 78FR-G-284 zeigten die monoklonalen Antikörper aller 11 Klone eine deutliche Bindungsaffinität, während sie mit der Gliomzellinie 78FR-G-219 keine Bindungsreaktionen eingingen (Tab. 9 und 11). Ein unterschiedliches Erkennungsmuster zeigten die 11 Klonprodukte hingegen bezüglich der Gliomzellinie 79FR-G-41. Nur sieben der elf selektierten monoklonalen Antikörper gingen Bindungsreaktionen mit Antigenen dieser Zellinie ein.

## 7. Kreuzreaktivität der selektierten monoklonalen Antikörper mit Zellen chemisch induzierter Kaninchengliome

Die Kulturüberstände der 11 selektierten Klone wurden im Hinblick auf ihr Bindungsvermögen mit fünf Kaninchengliomzellinien, deren Stammtumoren ebenfalls chemisch induziert worden waren, getestet. Das Bindungsverhalten der getesteten Klonprodukte war in den beiden angewandten Testmethoden (IPF, micro-ELISA) einheitlich.
Deutliche Kreuzreaktionen zeigten sich mit den Kaninchengliomzellinien 76RB-G-381, 77RB-G-34 und 77RB-G-359, während mit den Kaninchengliomzellinien 76RB-G-414-H und 77RB-G-58 keine Kreuzreaktionen nachgewiesen werden konnten (Tab. 10).

Die Testergebnisse der Klone, deren Kulturüberstände nicht mit normalen, syngenen Rattenzellen reagierten, jedoch z.T. mit Ratten- bzw. Kaninchengliomzellinien Bindungen eingingen, werden in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Kreuzreaktivität der selektierten monoklonalen Antikörper mit 4 weiteren chemisch-induzierten Rattengliomzellinien (micro-ELISA)

| Klon-produkt | 78FR-G-344 | 78FR-G-219 | 78FR-G-284 | 78FR-G-299 | 79FR-G-41 |
|---|---|---|---|---|---|
| $K^+$ | > 2000 | 831 | 919 | 711 | 487 |
| $K^-$ | 25 | 24 | 18 | 20 | 20 |
| 17AC2 | 319 | 33 | 72 | 74 | 56 |
| 17BC3 | 307 | 43 | 43 | 65 | 45 |
| 21AC3 | 373 | 40 | 90 | 91 | 43 |
| 21BC3 | 327 | 33 | 94 | 120 | 58 |
| 21CC1 | 344 | 32 | 63 | 100 | 25 |
| 21EC2 | 363 | 35 | 61 | 123 | 42 |
| 22AC1 | 393 | 31 | 80 | 107 | 39 |
| 22BC1 | 259 | 38 | 80 | 92 | 44 |
| 22FC3 | 322 | 25 | 67 | 137 | 29 |
| 24CC1 | 296 | 30 | 48 | 63 | 58 |
| 24IC3 | 303 | 42 | 63 | 107 | 28 |

Tabelle 10: Kreuzreaktivität der selektierten monoklonalen Antikörper mit Zellen chemisch-induzierter Kaninchengliome (micro-ELISA)

| Klon-produkt | 78FR-G-344 | 76RB-G-381 | 76RB-G-414-H | 77RB-G-34 | 77RB-G-58 | 77RB-G-359 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $K^+$ | >2000 | 800 | 1000 | 700 | >2000 | 500 |
| $K^-$ | 25 | 18 | 15 | 16 | 31 | 15 |
| 17AC2 | 319 | 82 | 24 | 72 | 33 | 134 |
| 17BC3 | 307 | 79 | 23 | 83 | 17 | 130 |
| 21AC3 | 373 | 102 | 24 | 105 | 20 | 144 |
| 21BC3 | 327 | 109 | 29 | 96 | 34 | 132 |
| 21CC1 | 344 | 91 | 26 | 133 | 24 | 156 |
| 21EC2 | 363 | 91 | 20 | 94 | 20 | 119 |
| 22AC1 | 393 | 105 | 19 | 131 | 24 | 114 |
| 22BC1 | 259 | 93 | 17 | 98 | 19 | 136 |
| 22FC3 | 322 | 113 | 21 | 130 | 27 | 145 |
| 24CC1 | 296 | 82 | 26 | 121 | 30 | 135 |
| 24IC3 | 303 | 105 | 26 | 154 | 28 | 213 |

Tabelle 11: Zusammenfassung der selektierten Klone, deren Produkte mit Ratten- bzw. Kaninchengliomzellinien reagierten, jedoch keine Bindungsreaktion mit syngenen Rattenzellen zeigten

| | "Target"-Zellen | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Rattengliomzellen | | | | | Kaninchengliomzellen | | | | | syng. Rattenzellen | |
| Klon-produkt | 78FR-G-344 | 78FR-G-219 | 78FR-G-284 | 78FR-G-299 | 79FR-G-41 | 76RB-G-381 | 76RB-G-414-H | 77RB-G-34 | 77RB-G-58 | 77RB-G-359 | Hirn | Niere |
| 17AC2 | ++ | - | + | ++ | + | ++ | - | + | - | ++ | - | - |
| 17BC3 | ++ | - | + | + | + | + | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 21AC3 | ++ | - | ++ | ++ | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 21BC3 | ++ | - | ++ | ++ | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 21CC1 | ++ | - | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 21EC2 | ++ | - | + | ++ | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 22AC1 | ++ | - | ++ | ++ | - | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 22BC1 | ++ | - | ++ | ++ | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 22FC3 | ++ | - | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 24CC1 | ++ | - | + | + | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |
| 24IC3 | ++ | - | + | ++ | - | ++ | - | ++ | - | ++ | - | - |

++ stark positiv
+ positiv
- negativ

## 8. Immunofluoreszenz-Test

Mit Hilfe des Immunofluoreszenz-Tests konnte bei knapp 10% der Zellen der Linie 78FR-G-299 eine spezifische Membranfluoreszenz nachgewiesen werden. Die fluoreszierenden, körnig strukturierten Reaktionsprodukte fanden sich in unterschiedlicher Verteilung an der Membran der Zellkörper bzw. der Zellfortsätze.
Diese Resultate können als ein weiterer Hinweis auf die Kreuzreaktivität der selektierten monoklonalen Antikörper mit der Rattengliomzellinie 78FR-G-299 gewertet werden.

## 9. Immunodiffusions-Test

Alle getesteten zehn- bis zwanzigfach konzentrierten Kulturüberstände der selektierten Klone bildeten im Agargel-Immunodiffusionstest gegen Ziegen-anti-Ratten-IgG nach ca. 24 Stunden Präzipitationslinien aus (Abb. 2). Die zusätzlich noch gegen Kaninchen-anti-Ratten-IgM getesteten Kulturüberstände zeigten hingegen keine Präzipitationsbanden. Diese Testergebnisse sprechen für die Anwesenheit von IgG im Kulturüberstand.

## 10. Quantitative Absorption

Um die Bindungsaffinität der selektierten monoklonalen Antikörper zu Rattengliomzellen bzw. auch zu anderen Rattenzellen aufzuzeigen, wurden jeweils 100 µl Hybridomkulturüberstand mit einer steigenden Zellmenge inkubiert.

Diese quantitativen Absorptionsversuche wurden sowohl mit der zur Immunisierung verwendeten Gliomzellinie 78FR-G-344 als auch der kreuzreagierenden Zellinie 78FR-G-299 durchgeführt. Darüber hinaus wurden als Kontrolltestreihen Kulturüberstände der selektierten Klone sowohl mit frisch entnommenen bzw. in vitro gezüchteten Hirnzellen fetaler, neugeborener und vier Wochen alter Fischerratten als auch mit Y3-Ag1.2.3.-Rattenmyelomzellen inkubiert. Die zellfrei zentrifugierten Probenüberstände wurden mit Hilfe der IPF und des micro-ELISA-Tests gegen die Gliomzellinie 78FR-G-344 auf noch vorhandene Antikörper untersucht.
Die Absorptionsergebnisse der beiden Rattengliomzellinien verdeutlichen, daß der Antikörpergehalt der Überstände mit steigenden zur Absorption verwendeten Zellzahlen abnimmt und schließlich bei $10^7$ Gliomzellen unter die Nachweisgrenze sinkt. Zusätzlich weisen einige Kurven im Anfangsbereich, also bei den niedrigeren zur Absorption verwendeten Zellzahlen, eine ansteigende Prozone auf.
Die parallel durchgeführten Kontroll-Absorptionsversuche mit Rattenhirn- bzw. Rattenmyelomzellen ließen hingegen keine Abnahme der Antikörperkonzentration der jeweiligen Hybridomüberstände erkennen (Abb. 3 und 4).

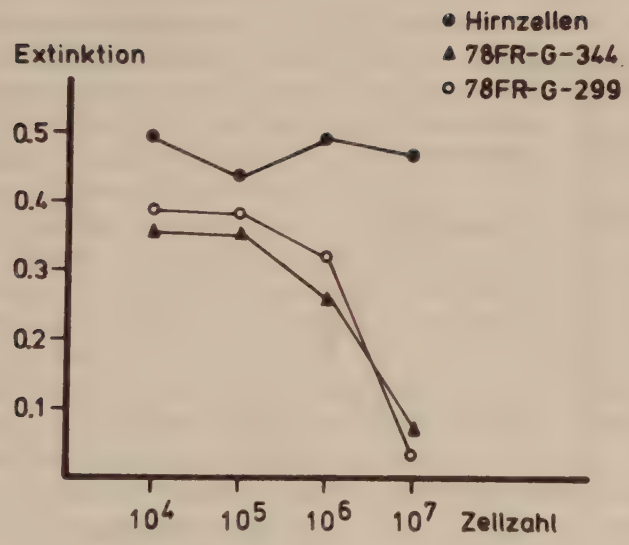


Abb. 3: Quantitative Absorption von monoklonalen Antikörpern aus dem Kulturüberstand des Klons 21AC3 mit Zellen chemisch induzierter Rattengliome (78FR-G-344 und 78FR-G-299) bzw. mit fetalen Fischerrattenhirnzellen (micro-ELISA)

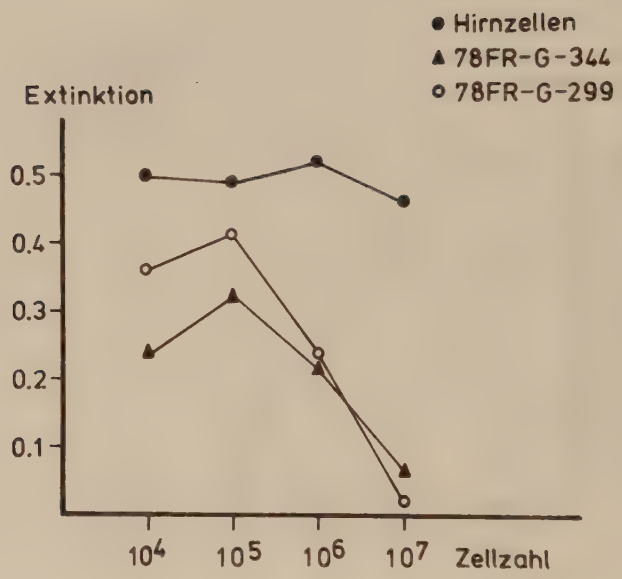


Abb. 4: Quantitative Absorption von monoklonalen Antikörpern aus dem Kulturüberstand des Klons 24CC1 mit Zellen chemisch induzierter Rattengliome (78FR-G-344 und 78FR-G-299) bzw. mit fetalen Fischerrattenhirnzellen (micro-ELISA)

## 11. Intraperitoneale Transplantation von Hybridomzellen

Da man im Serum bzw. in der Aszitesflüssigkeit von Subkutan- bzw. Aszitestumorträgern einen 100 bis 1000fach höheren Antikörpertiter erzielen kann als in Hybridomkulturüberständen (Goding, 1980), wurde versucht, dies durch eine intraperitoneale Injektion von Hybridomzellen in Balb/c Mäuse zu erreichen.
Zwischen $5 \times 10^6$ und $15 \times 10^6$ gut wachsende, vitale Hybridomzellen verschiedener Klone wurden in die Bauchhöhle von 4-5 Wochen vorher mit Pristane$^R$ behandelten Mäusen transplantiert. Die Tiere wurden täglich beobachtet. Sie zeigten jedoch keine Aszitesbildung, bei offensichtlich ungestörtem Allgemeinbefinden.
Nach einer Beobachtungszeit von 2-10 Wochen wurden die Mäuse getötet. Aus der, nach einer Bauchhöhlenspülung gewonnenen und in Kulturfläschchen transferierten Flüssigkeit konnten keine Hybridomzellen rückgewonnen bzw. etabliert werden.
Die Hälfte der Tiere hatte jedoch solide, stecknadel- bis streichholzkopfgroße Tumoren gebildet, die vor allem in Gekröse und Diaphragma lokalisiert waren.
Von vier Mäusen, denen einige Wochen vorher Hybridome transplantiert worden waren, wurde vor der Tötung Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde in verschiedenen Verdünnungsreihen auf seinen Antikörpergehalt untersucht. Hierbei konnte ein Titer von 1:100 000 ermittelt werden.

## DISKUSSION

Aus den in dieser Arbeit beschriebenen Fusionen zwischen Milzzellen hyperimmunisierter Fischerratten und Mäusemyelomzellen der Linie X63-Ag8.653 resultierten mindestens 414 verschiedene Hybridomkolonien (s. auch Tab. 4). Dies bedeutet bei 912 mit Zellen beschickten Linbroplatten-Vertiefungen eine Fusionsquote von 45,4%. Einhundert Hybridomkolonien (24,2% der Vertiefungen mit Wachstum) sezernierten Antikörper. Darunter konnten 11 Hybridomkolonien (= 11% der antikörperproduzierenden Kolonien) isoliert werden, deren Antikörper nur gegen Gliomzellen, nicht aber gegen normale Rattenzellen gerichtet waren. Diese Prozentzahlen liegen innerhalb der, auch von anderen Autoren bei Interspeziesfusionen aufgezeigten Resultate. So erzielten Hashimoto et al. (1981) 3%, Gasser et al. (1979) 7%, Schlom et al. (1980) 17%, Trowbridge et al. (1978) 19%, Levy et al. (1978b,c) 10-57% und Springer et al. (1978) 98% antikörperproduzierende Hybridome. Sikora und Phillips (1981) konnten 38% antikörperproduzierende Hybridome ermitteln, wobei die zur Fusion verwendeten Lymphozyten direkt aus dem Gliomgewebe einer Patientin gewonnen worden waren.
Howard et al. (1978), McKearn et al. (1978) und Minna et al. (1981) konnten aus ihren antikörperproduzierenden Hybridomkolonien lediglich 3-5% Klone isolieren, deren Produkte sich ausschließlich gegen das jeweilige Immunogen richteten.
Konstante Fusionserfolge stellten sich erst nach einer Abänderung der Fusionstechnik entsprechend den Richtlinien von Fazekas de St. Groth et al. (1980) ein. Von Bedeutung schien hierbei das Aussähen der Mäuseperitonealzellen auf die jeweiligen Linbroplatten schon einen Tag vor der Fusion zu sein. Die "feeder-layer"-Zellen konnten so ihre proliferationsfördernden Eigenschaften und eine ausreichende Schutzschicht gegenüber dem Plastikboden der Linbroplat-

ten ausbilden. Darüber hinaus schien sich die Fusionsquote ebenfalls zu verbessern, wenn möglichst viele der X63-Ag8.653-Myelomzellen in Suspension und nicht ausschließlich als "monolayer"-Kulturen wuchsen. Außerdem waren der 5%ige DMSO-Zusatz zur PEG-Lösung, der schonende Umgang mit den zur Fusion verwendeten Zellen, das besonders langsame Zugeben der PEG-Lösung, die nur durch das Schütteln des Fusionsgefäßes, nicht aber durch ein Aufpipettieren der Milz- und Myelomzellen mit diesen suspendiert wurde, die anschließende Ruhephase im temperierten Wasserbad, das langsame Verdünnen und das schonende Zentrifugieren, wichtig für das Gelingen der Fusion.
Beim anschließenden Verteilen der auf 200 ml verdünnten Zellsuspension war darauf zu achten, daß die entstandenen Zellklümpchen (Knutton et al., 1979) nicht durch zu heftiges Pipettieren zerstört wurden. Die Auswirkung der syngenen Immunisierung (s. auch Tab. 3) auf die Hybridomausbeute bzw. auf die Art der später sezernierten Immunglobuline läßt sich nur schwer beurteilen. Offensichtlich konnte aber mit diesem Immunisierungsmodus der Anteil an Hybridomkolonien, deren Antikörper nur gegen das Immunogen, nicht aber gegen normale Körperzellen gerichtet waren, im Vergleich zu anderen Autoren (Howard et al., 1978; McKearn et al., 1978; Minna et al., 1981) von knapp 5% auf 11% erhöht werden. Die Immunglobuline der selektierten Klone konnten alle der IgG-Klasse zugeordnet werden. Dies war für die Klonprodukte der Fusionen 1-22 zu erwarten, da durch die Erst- und Boosterinjektionen ein hoher Anteil der später IgG produzierenden "precursor"-B-Lymphozyten stimuliert werden sollte. Hingegen wäre entsprechend dem Immunisierungsmodus der Ratte von Fusion 24 (nur eine Gliomzellinjektion) ein höherer Anteil an IgM produzierenden Hybridomen zu erwarten gewesen. Darüber hinaus zeigten Gerhard et al. (1980), daß die Art der von Hybridomzellen sezernierten Immunglobuline auch davon abhängt, ob Milzlymphozyten oder

aber Lymphknoten-Lymphozyten zur Fusion verwendet werden. Milzzellhybriden sezernierten hierbei 72,8% IgG und 27,2% IgM. Lymphknoten-Zellhybriden hingegen produzierten 88,9% IgG, 7,4% IgA und 3,7% IgM.
Allgemein anzumerken ist, daß bei der Erstimmunisierung nur geringe Antigendosen s.c. bzw. i.p. injiziert wurden, um einerseits eine Immunparalyse zu vermeiden und andererseits nicht zu viele humorale Antikörper zu induzieren. Bei hohen Antikörpertitern könnten, wie auch bei einer intravenösen Antigenverabreichung, die bei einer Boosterinjektion applizierten Antigene neutralisiert und somit die Stimulierung der für die Fusion entscheidenden "memory"-Lymphozyten (sog. "precursor"-B-Lymphozyten) eingeschränkt bzw. verhindert werden (Buchmeier et al., 1980). Fusionen, die mit nicht aktivierten B-Lymphozyten durchgeführt wurden, erbrachten jedoch keine Hybridome (Andersson und Melchers, 1978).
Die intraperitoneale Boosterimmunisierung erfolgte frühestens nach einer Ruhezeit von 12 Wochen, um eine Neutralisation der applizierten Antigene zu vermeiden. Drei bis maximal fünf Tage nach der letzten Immunisierung sollte die Fusion erfolgen (Goding, 1980), da zu diesem Zeitpunkt die meisten "precursor"-B-Lymphozyten aktiviert sind. Später durchgeführte Fusionen bleiben meist erfolglos (Oi et al., 1978). Von verschiedenen Autoren wird auf die Instabilität der Hybridome hingewiesen (Köhler et al., 1976a,b; Yelton et al., 1978; Hengartner et al., 1978; Galfrê et al., 1980). Dies scheint in noch größerem Maße für Hybridome aus Interspeziesfusionen zu gelten (Schlom et al., 1980; Nowinski et al., 1980; Yarmush et al., 1980 und 1981; Sanchez-Madrid et al., 1983).
Hybridzellen neigen um so leichter zu einem irreversiblen Verlust ihrer Chromosomen, desto phylogenetisch entfernter ihre Fusionspartner sind (Köhler et al., 1978). Galfrê et

al. (1980) zeigten, daß bis zur Stabilisierung der Interspezieshybridzellen aus Ratte x Maus ein Chromosomenverlust von ca. 20-30 Chromosomen stattfindet. Die Summe beider elterlicher Zellen würde ca. 105-106 Chromosomen betragen, während die etablierten Klone nur 74-89 Chromosomen aufweisen. Eine Chromosomenanalyse verschiedener Hybridomzellen aus den Fusionen 12 und 15 ergab ähnliche Resultate. Die Chromosomenzahlen lagen für die untersuchten Interspezies-Hybridomzellen zwischen 79 und 92 Chromosomen. Somit besitzen diese Zellen zwischen 26 und 39 Chromosomen mehr, als die zur Fusion verwendeten X63-Ag8.653-Myelomzellen, die 53 Chromosomen aufweisen. Außerdem beweisen der tetraploide Chromosomensatz und das Überleben der Zellen im HAT-Selektivmedium zweifelsfrei, daß Zellfusionen zwischen Milz- und Myelomzellen stattgefunden hatten.

Ein weiterer Unsicherheitsfaktor im Hinblick auf die Stabilität der Hybridome ist das Überwuchern dieser durch nicht-produzierende Hybridomzellen (Gerhard et al., 1978). Nach McKearn et al. (1979) wird die Gefahr des Überwucherns durch "irrelevante" Hybridzellen bei einer entsprechend der "Poisson"-Verteilung errechneten Fusionsquote von 63% am geringsten gehalten. Darüber hinaus konnte durch ein frühzeitiges Isolieren und Klonieren der antikörperpositiven Hybridzellen die Stabilität der Hybridome über einen Zeitraum von über 8 Monaten aufrechterhalten werden. Auch andere Autoren (Ledbetter et al., 1979; Levy et al., 1980; Secher et al., 1980; Yarmush et al., 1980; Sanchez-Madrid et al., 1983) berichten von stabilen Interspezieshybridomen, die über acht, ja sechzehn Monate (McKearn et al., 1979) ihre Antikörperproduktion aufrechterhielten. Hingegen berichten Sikora und Phillips (1981) von Hybridomklonen, die schon acht Wochen nach der Fusion ihre Produktion an gegen Gliomzellen des Menschen gerichteten Antikörpern einstellten. Auch einige wenige Klone (8%) aus den hier

aufgeführten Experimenten hörten trotz guten Zellwachstums 6-24 Wochen nach der Fusion auf, Antikörper zu produzieren (s. auch Tab. 8). Soweit frühzeitig eingefrorene Zellchargen vorhanden waren, wurden mit diesen die Folgeversuchsreihen fortgesetzt. Die übrigen Hybridome waren stabil.

Aus den 100 antikörperpositiven Hybridomen konnten 11 selektiert werden, deren Antikörper Bindungen mit Antigenen bzw. Antigendeterminanten der Gliomzellinie 78FR-G-344 eingingen, jedoch keine nachweisbaren Reaktionen mit normalen Rattenzellen (Hirn, Niere) aufzeigten (s. auch Tab. 7). In der indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) erschienen einige der "target"-Zellen nicht oder nur partiell angefärbt. Von ähnlichen Beobachtungen berichten auch Schlom et al. (1980), Hashimoto et al. (1981), Yeh et al. (1981) und Stavrou et al. (1983a). Als mögliche Erklärungen dieses Phänomens könnten eine genetisch bedingte Heterogenität der Zellpopulation bzw. auch eine zellzyklusbedingte Variabilität der Antigenexpression angeführt werden.
Außer mit der zur Immunisierung verwendeten Zellinie 78FR-G-344 wurden die selektierten Klonprodukte auch noch mit vier weiteren ebenfalls chemisch induzierten Rattengliomzellinien getestet (Tabellen 9 und 11). Hierbei zeigten die verschiedenen monoklonalen Antikörper ein unterschiedliches Kreuzreaktionsmuster. Alle 11 selektierten Hybridomprodukte wiesen eine deutliche Kreuzreaktivität mit den Gliomlinien 78FR-G-299 und 78FR-G-284 auf. Mit der Gliomlinie 79FR-G-41 gingen hingegen nur sieben der elf selektierten monoklonalen Antikörper Bindungsreaktionen ein, während die Gliomlinie 78FR-G-219 von keinem der selektierten Hybridomprodukte erkannt wurde.
Des weiteren wurde das Bindungsverhalten der selektierten Hybridomprodukte mit fünf ebenfalls chemisch induzierten Kaninchengliomzellinien getestet (Tabellen 10 und 11).

Hier zeigten sich durchwegs deutliche Kreuzreaktionen mit den Kaninchengliomzellinien 76RB-G-381, 77RB-G-34 und 77RB-G-359, während mit den Zellinien 76RB-G-414-H und 77RB-G-58 keine Reaktionen nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß wenigstens ein Teil der durch Nitrosoharnstoff induzierten Gliome gleiche oder ähnliche Antigene bzw. Antigendeterminanten exprimieren. Aufgrund der durchgeführten Versuchsreihen konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die monoklonalen Antikörper nur ein Antigen oder aber mehrere unterschiedliche Antigendeterminanten an den verschiedenen Tumorzelllinien erkennen.

Mit Hilfe quantitativer Absorptionsversuche konnte die Spezifität des Bindungsverhaltens der selektierten monoklonalen Antikörper gegenüber Antigenen der Zellinien 78FR-G-344 und 78FR-G-299 nachgewiesen werden. Beide Gliomzellinien konnten bei steigenden Zellzahlen, die ursprünglich gleiche Antikörperkonzentration aus jeweils 100 µl Hybridomkulturüberstand graduell deutlich verringern (Abb. 3 und 4). Einige Absorptionskurven (s. auch Abb. 4) wiesen Prozonen auf, d.h. trotz steigender Zellzahlen und sinkender Antikörperkonzentration zeigt die Kurve anfänglich einen progressiven Verlauf. Auch verschiedene andere Autoren (Galfrè et al., 1977; Trowbridge et al., 1978; Koprowski et al., 1978; Herlyn et al., 1979; Bechtol et al., 1980c) berichten von diesem Phänomen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß vor dem Eintreten äquivalenter Antigen/Antikörper-Proportionen Antikörper im Überschuß vorliegen, und die Kurve deshalb bis zum Eintreten dieser äquivalenten Proportionen ansteigt (Roitt, 1977). Danach fällt die Kurve ab, da ein Antigenüberschuß eintritt. Bei einer Zellmenge von $10^7$ Gliomzellen pro 100 µl Hybridomüberstand konnte keine Antikörperreaktion mehr festgestellt werden. Hingegen war bei verschiedenen zur Kontrolle durchgeführten quantiativen Absorptionsversuchen mit Hirnzellen von fetalen, neugeborenen

und 4 Wochen alten Fischerratten bzw. mit Rattenmyelomzellen der Linie Y3-Ag1.2.3. selbst bei $10^7$ zur Absorption verwendeten Zellen kein Abfallen der Antikörperkonzentration zu verzeichnen (Abb. 3 und 4). Dies unterstreicht das spezifische Bindungsverhalten der selektierten monoklonalen Antikörper.

Weiterhin ungeklärt bleibt allerdings, inwieweit es sich bei den hier mittels monoklonalen Antikörpern nachgewiesenen gliomassoziierten Antigenen um Neoantigene (Sikora et al., 1982a), Differenzierungsantigene (Moldenhauer et al., 1982; Wikstrand et al., 1982) oder um Antigene, die alle Gewebe eines gemeinsamen ektodermalen Ursprungs (Schnegg et al., 1981b) exprimieren, handelt. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper können in der Zukunft diese Antigene näher definiert werden.

Die größte Bedeutung haben Interspezieshybridome jedoch im Hinblick auf die Gewinnung monoklonaler Antikörper von Spezies, bei denen noch keine fusionierbaren Myelomzellen bzw. noch keine "non-producer"-Myelomzellen etabliert werden konnten. Sobald derartige Myelomzellen des Menschen für Zellfusionen zur Verfügung stehen, werden diese die derzeitige Bedeutung von Interspeziesfusionen (Mensch x Tier) mindern, da man dann monoklonale Antikörper des Menschen direkt aus Intraspeziesfusionen (Mensch x Mensch) gewinnen und gezielt für Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen anwenden wird.

## ZUSAMMENFASSUNG

Antikörperproduzierende Hybridzellen wurden durch Fusion von Mäusemyelomzellen der Linie X63-Ag8.653 und Rattensplenozyten hergestellt. Zuvor waren die Ratten gegen die syngene Gliomlinie 78FR-G-344 immunisiert worden, einer Zellinie, die aus einem Nitrosoharnstoff induzierten Rattengliom etabliert wurde.
In 24 Fusionsversuchen konnten 414 Plattenvertiefungen mit Hybridomwachstum ermittelt werden. Aus den hieraus resultierenden 100 antikörperproduzierenden Hybridomkolonien konnten 11 verschiedene Klone isoliert werden, deren Antikörper selektiv Bindungen mit Gliomzellen, nicht aber mit normalen Rattenzellen eingingen. Kreuzreaktionen konnten bei unterschiedlichem Erkennungsmuster mit drei der vier getesteten Rattengliomlinien bzw. mit drei der fünf getesteten Kaninchengliomlinien nachgewiesen werden.
Das spezifische Bindungsvermögen der selektierten monoklonalen Antikörper zu Gliomantigenen konnte mit Hilfe der quantitativen Absorption nachgewiesen werden.
Die Antikörper der selektierten Klone konnten der Immunglobulinklasse G zugeordnet werden. Darüber hinaus konnte die Mehrzahl der selektierten Klone ihre Antikörperproduktion über einen Zeitraum von mehr als acht Monaten stabil aufrechterhalten.
Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sich die monoklonalen Antikörper dieser Interspezieshybridome zur Analyse immunbiologischer Vorgänge bei Gliomen. Überdies könnten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern aus Interspeziesfusionen (insbesondere Mensch x Tier) Tumoren zum Zwecke der Diagnose dargestellt und gegebenenfalls ihr Wachstumsverhalten beeinflußt werden.

---

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die W. Sander-Stiftung (Sta-81.007.01) durchgeführt.

SUMMARY

Establishment of interspecies hybridomas (mouse x rat) which produce monoclonal antibodies against gliomas

Hybrid cells which produce antibodies were made by fusing mouse-myeloma cells of the cell line X63-Ag8.653 with rat splenocytes. Spleens were taken from rats primed with glioma cells of the line 78FR-G-344, established from a chemically induced rat glioma.
In 100 wells out of 414 which showed hybridoma growth, cells were found to produce antibodies against the immunogen. From these hybridomas 11 clones were isolated. Their antibodies showed a specific binding affinity to rat glioma cells but not to normal rat cells. Cross reactions of the selected monoclonal antibodies were demonstrated with the cell lines of three additional chemically induced rat- and rabbit gliomas respectively. These antibodies showed partly different recognition patterns. Furthermore the selected monoclonal antibodies were tested with another rat glioma cell line and two additional rabbit glioma cell lines. However they showed no cross reactions.
The specific binding ability of the selected monoclonal antibodies with glioma antigens was proved by quantitative absorption.
The selected monoclonal antibodies were shown to be IgG.
In addition to this the majority of the selected hybridomas were able to maintain the secretion of antibodies for more than eight months.
Due to their properties the monoclonal antibodies of these interspecies hybridomas are suitable for analysing immune biological processes in gliomas. Furthermore monoclonal antibodies of interspecies hybridomas (especially human x animal) could be used for showing tumors in diagnosis and possibly for influencing the tumor growth.

LITERATURVERZEICHNIS

Andersson, J., Melchers, F.: The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 130-139 (1978)

Ashwood-Smith, M.J.: Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulphoxide. Nature, 190, 1204-1205 (1961)

Bazin, H., Deckers, C., Beckers, A., Heremans, J.F.: Transplantable immunoglobulin-secreting tumours in rats. I. General features of Lou/Ws1 strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins. Int. J. Cancer, 10, 568-580 (1972)

Bazin, H.: Production of rat monoclonal antibodies with the Lou rat non secreting IR983F myeloma cell line. In: Protides of the biological fluids, 29th colloquium 1981, edited by H. Peeters, Pergamon Press 1982

Bechtol, K.B.: Radioimmunoassay. In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980a

Bechtol, K.B.: Quantitative absorption/blocking assay. In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980b

Bechtol, K.B., Jonak, Z.L., Kennett, R.H.: Germ-cell-related and nervous-system-related differentiation and tumor antigens. In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980c

Bilzer, T., Stavrou, D., Dahme, E., Anzil, A.P.: Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and in vitro immune cytolysis. Anticancer Research, 2, 345-354 (1982)

Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O., Johnson, K.M.: Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus react with pathogenic arenaviruses. Nature, 288, 486-487 (1980)

Burnet, F.M.: The clonal selection therapy of aquired immunity. Cambridge University Press, Cambridge England 1959

Burtonboy, G., Bazin, H., Deckers, C., Beckers, A., Lamy, M.E., Heremans, J.F.: Transplantable immunoglobulin-secreting cell lines from Lou/Ws1 strain rats. Europ. J. Cancer, 9, 259-262 (1973)

Carrel, S., Tribolet, de,N., Mach, J.-P.: Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas and neuroblastomas. Acta Neuropathol. (Berl.), 57, 158-164 (1982)

Coakham, H.B.: Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells. Nature, 250, 328-330 (1974)

Coakham, H.B., Kornblith, P.L., Quindlen, E.A., Pollock, L.A., Wood, W.C., Hartnett, L.C.: Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: in vitro study with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays. J. Nat. Canc. Inst., 64, 223-233 (1980)

Coffino, P., Baumal, R., Laskov, R., Scharff, M.D.: Cloning of mouse myeloma cells and detection of rare variants. J. Cell. Physiol., 79, 429-440 (1972)

Coons, A.H.: The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci., 69, 658-662 (1957)

Cornain, S., Carnaud, C., Silverman, D., Klein, E., Rajewsky, M.F.: Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specifity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes.
Int. J. Cancer, 16, 301-311 (1975)

Croce, C.M., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D'Ancona, G., Dolby, T.W., Koprowski, H.: Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3416-3419 (1979)

Croce, C.M., Linnenbach, A., Hall, W., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Production of human hybridomas secreting antibodies to measles virus.
Nature, 288, 488-489 (1980)

Davidson, R.L., Ephrussi, B., Yamamoto, K.: Regulation of pigment synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 1437-1440 (1966)

Davidson, R.L., Gerald, P.S.: Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol.
Somatic Cell Genetics, 2, 165-176 (1976)

Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Houghton, A.N., Li, L.T.C., Ikeda, H., Oettgen, H.F., Old, L.J.: Human melanoma antigens defined by monoclonal antibodies.
In: Mitchell, M.S., Oettgen, H.F. (eds.) Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment, Raven Press 1982

Douillard, J.Y., Hoffman, T., Herberman, R.B.: Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production: use of intact cells as antigen.
J. Immunol. Meth., 39, 309-316 (1980)

Edwards, P.A.W., Smith, C.M., Neville, A.M., O'Hare, M.J.: A human-human hybridoma system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia-derived line. Eur. J. Immunol., 12, 641-648 (1982)

Ephrussi, B., Weiss, M.C.: Interspecific hybridization of somatic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 1040-1042 (1965)

Fazekas de St. Groth, S., Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J. Immunol. Methods, 35, 1-21 (1980)

Fey, H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N., Grolimund, F.: Methods of isolation, purification and quantitation of bovine immunoglobulins. Zbl. Vet. Med., B, 23, 269-300 (1976)

Fields, K.L., Gosling, C., Megson, M., Stern, P.L.: New cell surface antigens in rat defined by tumors of the nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1296-1300 (1975)

Fischer, A., Brown, G.: A rapid method of determining whether monoclonal antibodies react with the same or different antigens on the cell surface. J. Immunol. Methods, 39, 377-385 (1980)

Galfré, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature, 266, 550-552 (1977)

Galfré, G., Milstein, C., Wright, B.: Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature, 277, 131-133 (1979)

Galfré, G., Butcher, W., Howard, J.C., Wilde, C.D., Milstein, C.: Clonal competition and stability of hybrid myelomas of mouse and rat origin. Transplantation Proceedings, XII, No. 3, 371-375 (1980)

Gasser, D.L., Winters, B.A., Haas, J.B., McKearn, T.J., Kennet, R.H.: Monoclonal antibody directed to a B-cell antigen present in rats, mice, and humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4636-4640 (1979)

Gerhard, W., Croce, C.M., Lopes, D., Koprowski, H.: Repertoire of antiviral antibodies expressed by somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1510-1514 (1978)

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Lopes, A.D., Staudt, L.: Monoclonal antibodies against influenza virus. In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Goding, J.W.: Conjugation of antibodies with fluorochromes: modification to the standard methods. J. Immunol. Methods, 13, 215-226 (1976)

Goding, J.W.: Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Methods, 39, 285-308 (1980)

Harris, H., Watkins, J.F., Campbell, G. Le M., Evans, E.P., Ford, C.E.: Mitosis in hybrid cells derived from mouse and man. Nature, 207, 606-608 (1965)

Hashimoto, Y., Masuko, T.: Hybridoma established from spleen cells of a rat immune to syngeneic bladder tumor: its secretion of monoclonal antibody specific for a tumor cell clone in a long-term transplanted bladder tumor line. Gann, 72, 329-330 (1981)

Hellström, K.E., Hellström, I., Brown, J.P.: Unique and common tumor-specific transplantation antigens of chemically induced mouse sarcomas. Int. J. Cancer,21, 317-322 (1978)

Hellström, K.E., Brown, J.P., Hellström, I.: Monoclonal antibodies to tumor antigens. Contemp. Top. Immunobiol., Vol. II (1980)

Hellström, K.E., Brown, J.P., Hellström, I.: Four melanoma-associated antigens (3.1, p97, p155, p210) defined by monoclonal mouse antibodies.
In: Mitchell, M.S., Oettgen, H.F. (eds.) Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment, Raven Press 1982

Hengartner, H., Luzatti, A.L., Schreier, M.: Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag8.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 92-99 (1978)

Herberman, R.B.: Immunogenicity of tumor antigens.
Biochem. Biophys. Acta, 473, 93-119 (1977)

Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., Koprowski, H.: Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1438-1442 (1979)

Horibata, K., Harris, A.W.: Mouse myelomas and lymphomas in culture.
Exp. Cell Res., 60, 61-77 (1970)

Howard, J.C., Butcher, G.W., Galfrê, G., Milstein, C.: Monoclonal anti-rat MHC (H-1) alloantibodies.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 54-60 (1978)

Jonak, Z.L.: Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Karpas, A., Fischer, P., Swirkski, D.: Human plasmacytoma with an unusual karyotype growing in vitro and producing light-chain immunoglobulin.
The Lancet, 1, 931-933 (1982)

Katz, D.H., Benacerraf, B. (eds.): The role of the products of the histocompatibility gene complex in immune-response.
Acad. Press, New York 1976

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol., 123, 1548-1550 (1979)

Kennett, R.H., Denis, K.A., Tung, A.S., Klinman, N.R.: Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 77-91 (1978)

Klebe, R.J., Mancuso, M.D.: Chemicals which promote cell hybridization. Somatic Cell Genetics, 7, 473-488 (1981)

Klinman, N.R., Press, J.L., Sigal, N.H., Gerhart, P.J.: The generation of antibody diversity. Cunningham, A.J. (ed.), Academic Press, London, 127-149 (1976)

Knutton, S., Pasternak, C.A.: The mechanism of cell-cell fusion. Trends Biochem. Science, 4, 220-223 (1979)

Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifity. Nature, 256, 495-497 (1975)

Köhler, G., Howe, S.C., Milstein, C.: Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol., 6, 292-295 (1976a)

Köhler, G., Milstein, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976b)

Köhler, G., Shulman, M.J.: Cellular and molecular restrictions of the lymphocyte fusion. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 143-151 (1978)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., Herlyn, M.: Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3405-3409 (1978)

Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., Fuhrer, P.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somatic Cell Genetics, 5, 957-972 (1979)

Kornblith, P.L., Dohan, F.C., Wood, W.C., Whitman, B.O.: Human astrocytoma serum-mediated immunologic response. Cancer, 33, 1512-1519 (1974)

Kumar, S., Taylor, G.: Specific lymphocytotoxicity and blocking factors in tumours of the central nervous system. Brit. J. Cancer, 28, 135-141 (1973)

Kummer, U., Thiel, E., Doxiades, I., Eulitz, M., Stadoljev, S., Thierfelder, S.: Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl(2,3-$^{3}$H)propionate: use in detecting monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods, 42, 367-374 (1981)

Lansdorp, P.M., Astaldi, G.C.B., Oosterhof, F., Janssen, M.C., Zeijlemaker, W.P.: Immunoperoxidase procedures to detect monoclonal antibodies against cell surface antigens. Quantitation of binding and staining of individual cells. J. Immunol. Meth., 39, 393-405 (1980)

Ledbetter, J.A., Herzenberg, L.A.: Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunological Rev., 47, 63-90 (1979)

Lefkovits, I.: Induction of antibody-forming cell clones in microcultures. Eur. J. Immunol., 2, 360-366 (1972)

Lefkovits, I., Waldman, H.: Limiting dilution analysis of cells in the immune system.
Cambridge Univ. Press 1979

Lemonnier, F., Burakoff, S.J., Germain, R.N., Benacerraf, B.: Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1229-1233 (1977)

Lennox, E.S., Sikora, K.: Definition of human tumour antigens.
In: McMichael, A.J., Fabre, J.W. (eds.)
Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, 111-128, Academic Press 1982

Lernhardt, W., Andersson, J., Coutinho, A., Melchers, F.: Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%.
Exp. Cell Res., 111, 309-316 (1978)

Levy, R., Dilley, J., Lampson, L.A.: Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse monoclonal antibodies as probes.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 164-169 (1978a)

Levy, R., Dilley, J., Sikora, K., Kucherlapati, R.: Mouse-human hybridomas. The conversion of non-secreting human B cells into Ig secretors.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 170-172 (1978b)

Levy, R., Dilley, J.: Rescue of immunoglobulin secretion from human neoplastic lymphoid cells by somatic cell hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2411-2415 (1978c)

Levy, R., Dilley, J., Brown, S., Bergman, Y.: Mouse x human hybridomas.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.)
Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Littlefield, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145, 709 (1964)

McKearn, T.J., Sarmiento, M., Weiss, A., Stuart, F.P., Fitch, F.W.: Selective suppression of reactivity to rat histocompatibility antigens by hybridoma antibodies. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 61-65 (1978)

McKearn, T.J., Fitch, F.W., Smilek, D.E., Sarmiento, M., Stuart, F.P.: Properties of rat anti-MHC antibodies produced by cloned rat-mouse hybridomas. Immunological Rev., 47, 91-115 (1979)

McKearn, T.J.: Method for growing hybridomas in rats or mice. In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Minna, J.D., Cuttitta, F., Rosen, S., Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Krasnow, S.: Methods for production of monoclonal antibodies with specificity for human lung cancer cells. In vitro, 17, 1058-1070 (1981)

Mishell, B.B., Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular immunology. Freeman and Companie, San Francisco 1980

Mitchell, K.F., Fuhrer, J.P., Steplewski, Z., Koprowski, H.: Biochemical characterization of human melanoma cell surfaces: dissection with monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7287-7291 (1980)

Moldenhauer, G., Haustein, D., Hüppe, T., Wagner, A., Hartmann, K.-U.: A new murine cell surface differentiation antigen (Leugp 90) defined by a rat monoclonal antibody: cellular distribution and biochemical characterization. J. Immunol., 128, 2664-2669 (1982)

Morantz, R.A., Wood, G.W., Foster, M., Clark, M., Gollahon, K.: Macrophages in experimental and human brain tumors. I. Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity. J. Neurosurg., 50, 298-304 (1979)

Muralt, de, B., Tribolet, de, N., Diserens, A.-C., Carrel, S., Mach, J.-P.: Reactivity of antiglioma monoclonal antibodies for a large panel of cultured gliomas and other neuroectoderm derived tumors. Anticancer Res., 3, 1-6 (1983)

Neff, J.M., Enders, J.F.: Poliovirus replication and cytopathogenicity in monolayer hamster cell cultures fused with beta propiolactone-inactivated Sendai virus (32668). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 260-267 (1968)

Neuwelt, E.A., Clark, W.K.: Clinical aspects of neuroimmunology. Baltimore, Williams and Williams Company 1978

Nexø, B.A.: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled antibodies. Virology, 77, 849-852 (1977)

Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S.G.O., Pontén, J.: Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. Clin. Exp. Immunol., 7, 477-489 (1970)

Norwood, T.H., Zeigler, C.J., Martin, G.M.: Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. Somat. Cell Genet., 2 (3), 263-270 (1976)

Nowinski, R., Berglund, C., Lane, J., Lostrom, M., Bernstein, I., Young, W., Hakomori, S.-I.: Human monoclonal antibody against Forssman antigen. Science, 210, 537-539 (1980)

Oi, V.T., Jones, P.P., Goding, J.W., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A.: Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2 and Ia antigens. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 115-129 (1978)

Oi, V.T., Herzenberg, L.A.: Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. In: Selected Methods in Cellular Immunology, 351-372, Freeman, San Franzisko 1980

Olsson, L., Kaplan, H.S.: Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5429-5431 (1980)

Ouchterlony, Ö.: Diffusions-in-gel methods for immunological analysis II. Progr. Allergy, 6, 30-154 (1962)

Parks, D.R., Brayan, V.M., Herzenberg, L.A.: Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 76, 1962-1966 (1979)

Pateraki, E., Guesdon, J.-L., Serie, C., Avrameas, S.: TERELISA: The ELISA test performed in Terasaki plates. J. Immunol. Methods, 46, 361-368 (1981)

Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen. De Gryter, New York - Berlin 1980

Pfreundschuh, M., Shiku, H., Takahashi, T., Ueda, R., Ransohoff, J., Oettgen, H.F., Old, L.J.: Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5122-5126 (1978)

Pfreundschuh, M., Cravioto, H., Röhrich, M.: Serological analysis of nitrosourea-induced rat gliomas. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 99, A71-A72 (1981)

Posner, M.R., Antoniou, D., Griffin, J., Schlossman, S.F., Lazarus, H.: An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.
J. Immunol. Meth., 48, 23-31 (1982)

Potter, M.: Immunoglobulin producing tumors and myeloma proteins in mice.
Phys. Rev., 52, 631-719 (1972)

Prager, M.D., Baechtel, F.S.: Methods for modification of cancer cells to enhance their antigenicity.
Meth. Cancer Res., 9, 339-400, Acad. Press (1973)

Reisfeld, R.A., Morgan, A.C., Bumol, T.F.: Production and characterization of a monoclonal antibody to human melanoma associated antigens.
In: Mitchell, M.S., Oettgen, H.F. (eds.)
Hybridomas in Cancer Diagnosis and Treatment,
Raven Press 1982

Roitt, I.: Leitfaden der Immunologie.
Darmstadt, Steinkopfverlag 1977

Rothfels, K.H., Siminovitch, L.: An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro.
Stain tech., 33, 73-77 (1958)

Sanchez-Madrid, F., Szklut, P., Springer, T.A.: Stable hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster monoclonal antibodies of defined specificity.
J. Immunol., 130, 309-312 (1983)

Scaletta, L.J., Rushforth, N.B., Ephrussi, B.: Isolation and properties of hybrids between somatic mouse and chinese hamster cells.
Genetics, 57, 107-124 (1967)

Schimmelpfennig, L., Langenberg, U., Peters, J.H.: Macrophages overcome mycoplasma infections of cells in vitro. Nature, 285, 661-662 (1980)

Schlom, J., Wunderlich, D., Teramoto, Y.A.: Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6841-6845 (1980)

Schnegg, J.-F., Tribolet, de, N., Diserens, A.-C., Martin-Achard, A., Carrel, S.: Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum. Int. J. Cancer, 28, 265-259 (1981a)

Schnegg, J.-F., Diserens, A.-C., Carrel, S., Accolla, R.S., Tribolet, de, N.: Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies. Cancer Res., 14, 1209-1213 (1981b)

Schwaber, J., Cohen, E.P.: Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. Nature, 244, 444-447 (1973)

Schwaber, J.: Immunoglobulinproduction by a human-mouse somatic cell hybrid. Exp. Cell Res., 93, 343-354 (1975)

Secher, D.S.: Monoclonal antibodies by cell fusion. Immunology Today, 2, 22-26 (1980)

Seeger, R.C., Rosenblatt, H.M., Imai, K., Ferrone, S.: Common antigenic determinants on human melanoma, glioma, neuroblastoma and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies. Cancer Res., 41, 2714-2717 (1981)

Sheikh, K.M.A., Apuzzo, M.L.J., Kochsiek, K.R., Weiss, M.H.: Malignant glial neoplasms: Definition of a humoral host response to tumor-associated antigen(s). Yale J. Biol. Med., 50, 397-403 (1977)

Shulman, M., Wilde, C.D., Köhler, G.: A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature, 276, 269-270 (1978)

Sikora, K., Phillips, J.: Human monoclonal antibodies to glioma cells. Br. J. Cancer, 43, 105-107 (1981)

Sikora, K., Alderson, T., Phillips, J., Watson, J.V.: Human hybridomas from malignant gliomas. The Lancet, 2, 11-14 (1982a)

Sikora, K.: Monoclonal antibodies in oncology. (Review article). J. Clin. Pathol., 35, 369-375 (1982b)

Singh, G., Bazin, H., Ladoulis, C.T.: In-vitro synthesis and release of immunoglobulins by thymocytes of inbred rats. Molecular Immunology, 16, 755-766 (1979)

Spence, A.M., Hellström, K.E., Hellström, I., Belle, van, G., Sullivan, K., Wahlström, T.: Immunization against ethylnitrosourea-induced autochthonous neurogenic rat tumours. Br. J. Cancer, 40, 164-167 (1979)

Springer, T., Galfrè, G., Secher, D.S., Milstein, C.: Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. Eur. J. Immunol., 8, 539-551 (1978)

Stavrou, D., Anzil, A.P., Weidenbach, W., Rodt, H.: Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in gliomas. J. Neurolog. Sci., 33, 275-282 (1977)

Stavrou, D., Elling, H., Osterkamp, U.: Zytotoxische Antikörper gegen experimentelle Gliome. Zbl. Allg. Path., 121, 568 (1977)

Stavrou, D., Anzil, A.P., Elling, H.: Tumor specific fluorescent and complement-dependent cytotoxic antibodies in the serum of rats with chemically induced brain gliomas.
Acta Neuropath., 43, 111-117 (1978)

Stavrou, D., Zänker, K., Anzil, A.P.: Morphological, immunocytochemical and biological characteristics of experimental rabbit brain tumors in tissue culture.
J. Neurolog. Sci., 42, 365-379 (1979)

Stavrou, D., Hultén, M., Anzil, A.P., Bilzer, T.: The humoral antibody response of rats immunized with chemically modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int. J. Cancer, 26, 629-637 (1980a)

Stavrou, D., Hultén, M., Bilzer, T.: Potenzierung der Antigenität von Gliomzellen durch chemische Modifikation.
Verh. Dtsch. Ges. Path., 64, 466 (1980b)

Stavrou, D., Hultén, M., Bilzer, T.: Chemical modification and antigenicity of glioma cells.
Acta Neuropathol., Suppl. VII, 75-78 (1981)

Stavrou, D., Süss, C., Bilzer, T., Kummer, U., Tribolet, de, N.: Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines derived from experimental brain tumors.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 18, 1439-1449 (1983a)

Stavrou, D., Bilzer, T., Tsangaris, T., Dürr, E., Steinecke, M., Anzil, A.P.: Presence and absence of virus particles in hybridomas secreting monoclonal antibodies against gliomas.
J. Cancer Res. Clin. Oncol., 106, 77-80 (1983b)

Steele, G.J., Sjögren, H.O.: Crossreacting tumor-associated antigen(s) among chemically induced rat coloncarcinomas.
Cancer Res., 34, 1801-1807 (1974)

Suter, L., Brüggen, J., Sorg, C.: Use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for screening of hybridoma antibodies against cell surface antigens.
J. Immunol. Meth., 39, 407-411 (1980)

Tribolet, de, N., Carrel, S.: Human glioma tumor-associated antigens.
Cancer Immunol. Immunother., 9, 207-211 (1980)

Trowbridge, I.S.: Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein T200.
J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)

Wahlström, T., Saksela, E., Troupp, H.: Cell-bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of the brain.
Cell. Immunol., 6, 161-170 (1973)

Wahlström, T., Linder, E., Saksela, E., Westermark, B.: Tumor-specific membrane antigens in established cell lines from gliomas.
Cancer, 34, 274-279 (1974)

Warnatz, H.: Tumorimmunologie.
Stuttgart:Thieme 1975

Weiss, M.C., Green, H.: Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes.
Genetics, 58, 1104-1111 (1967)

Wikstrand, C.J., Mahaley, M.S., Bigner, D.D.: Surface antigenic characteristics of human glial brain tumor cells.
Cancer Res., 37, 4267-4275 (1977)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Surface antigens of human glioma cells shared with normal adult and fetal brain.
Cancer Res., 39, 3235-3243 (1979)

Wikstrand, C.J., Bigner, D.D.: Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.
Cancer Res., 42, 267-275 (1982)

Woosley, R.E., Mahaley, M.S., Mahaley, J.L., Miller, G.M., Brooks, W.H.: Immunobiology of primary intracranial tumors. III. Microcytotoxicity assays of specific immune responses of brain tumor patients.
J. Neurosurg., 47, 871-885 (1977)

Yarmush, M.L., Gates, F.T., Weisfogel, D.R., Kindt, T.J.: Identification and characterization of rabbit-mouse hybridomas secreting rabbit immunoglobulin chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2899-2903 (1980)

Yarmush, M.L., Gates, F.T., Dreher, K.L., Kindt, T.J.: Serologic and structural characterization of immunoglobulin chains secreted by rabbit-mouse hybridomas.
J. Immunol., 126, 2240-2244 (1981)

Yeh, M.-Y., Hellström, I., Hellström, K.E.: Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.
J. Immunol., 126, 1312-1317 (1981)

Yelton, D.E., Diamond, B.A., Kwan, S.-P., Scharff, M.D.: Fusion of mouse myeloma and spleen cells.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 1-7 (1978)

Yelton, D.E., Margulies, D.H., Diamond, B.A., Scharff, M.D.: Plasmacytomas and hybridomas.
In: Kennett, R.H., McKearn, T.J., Bechtol, K.B. (eds.) Monoclonal Antibodies, Plenum Press 1980

Ich möchte allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit geholfen haben, herzlich danken.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. D. Stavrou, für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich Frau D. Wallmann für ihre technische Assistenz meinen Dank aussprechen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. T. Bilzer, am Institut für Tierpathologie, für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie Herrn Dr. J. Delinassios, am Hellenic Anticancer Institute, für die Chromosomenanalyse der Hybridomzellen.

Sehr wesentlich waren die technischen Hilfeleistungen von Frau A. Lechner und Herrn S. Lutz.

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 1957 | geboren am 20. Mai in Creglingen/Württemberg |
| | Vater: Dr. med. vet. Gustav Dürr<br>Prakt. Tierarzt |
| | Mutter: Babette Dürr, geb. Vidal |
| 1963 - 1967 | Besuch der Grundschule in Creglingen |
| 1967 - 1976 | Besuch des Gymnasiums in Weikersheim |
| | 20. Mai Reifezeugnis |
| 1976 - 1981 | Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1981 | 2. November Beginn der Dissertation am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie (Prof. Dr. D. Stavrou) der Universität München |
| | 30. November Approbation als Tierärztin |
| 1982 | 1. Januar - 31. Dezember Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, der Universität München |
| 1983 - 1984 | Freie Forschungstätigkeit am Institut für Tierpathologie, Abteilung Funktionelle Pathologie, der Universität München mit dem Ziel der Promotion. |